



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS CELULARES PARA VALIDACIÓN PRECLÍNICA DE COMPUESTOS ANTI –TUMORALES

Memoria presentada por la licenciada

Maria Victoria Moneo Ocaña

Para optar al grado de

Doctora en Biología Molecular

por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: **Dr. Amancio Carnero Moya**

Madrid, 2009

A mi marido
A mi hijo

Pero alejado y solitario, más allá de barcas y playas, está practicando Juan Salvador Gaviota. A treinta metros de altura, bajó sus pies palmeados, alzó su pico, y se esforzó por mantener en sus alas esa dolorosa y difícil posición requerida para lograr un vuelo pausado. Aminoró su velocidad hasta que el viento no fue más que un susurro en su cara, hasta que el océano pareció detenerse allá abajo. Entornó los ojos en feroz concentración, contuvo el aliento, forzó aquella torsión un... sólo... centímetro... más... Encrespáronse sus plumas, se atascó y cayó. Las gaviotas, como es bien sabido, nunca se atascan, nunca se detienen. Detenerse en medio del vuelo es para ellas vergüenza, y es deshonor. Pero Juan Salvador Gaviota, sin avergonzarse, y al extender otra vez sus alas en aquella temblorosa y ardua torsión -parando, parando, y atascándose de nuevo-, no era un pájaro cualquiera. La mayoría de las gaviotas no se molesta en aprender sino las normas de vuelo más elementales: como ir y volver entre playa y comida. Para la mayoría de las gaviotas, no es volar lo que importa, sino comer. Para esta gaviota, sin embargo, no era comer lo que le importaba, sino volar. Más que nada en el mundo, Juan Salvador Gaviota amaba volar. Este modo de pensar, descubrió, no es la manera con que uno se hace popular entre los demás pájaros. Hasta sus padres se desilusionaron al ver a Juan pasarse días enteros, solo, haciendo cientos de planeos a baja altura, experimentando.

A medida que se hundía, una vez hueca y extraña resonó en su interior. No hay forma de evitarlo. Soy gaviota. Soy limitado por la naturaleza. Si estuviese destinado a aprender tanto sobre volar, tendría por cerebro cartas de navegación. Si estuviese destinado a volar a alta velocidad, tendría las alas cortas de un halcón, y comería ratones en lugar de peces. Mi padre tenía razón. Tengo que olvidar estas tonterías. Tengo que volar a casa, a la Bandada, y estar contento de ser como soy: una pobre y limitada gaviota.

Había pasado un mes tan sólo cuando Juan dijo que había llegado la hora de volver a la Bandada. - ¡No estamos preparados! -dijo Enrique Calvino Gaviota-. ¡Ni seremos bienvenidos! ¡Somos Exiliados! No podemos meternos donde no seremos bienvenidos, ¿verdad? -Somos libres de ir donde queramos y de ser lo que somos -contestó Juan, y se elevó de la arena y giró hacia el Este, hacia el país de la Bandada.

Juan Salvador Gaviota, Richard Bach.

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Grupo de Desarrollo de Ensayos, Departamento de Terapias Experimentales del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) bajo la dirección del **Dr. Amancio Carnero Moya**.

AGRADECIMIENTOS

Sólo el corazón sabe la ilusión que se pone en cada proyecto. Para mi hacer la tesis doctoral ha sido un sueño hecho realidad. Siempre he visto la ciencia de una forma muy romántica, y siempre he admirado a la gente que se dedica a ella. Ha sido mucha la gente con la que he compartido este sueño, y a la que quisiera agradecer el apoyo que me han ofrecido y el tiempo que me han dedicado. Por eso quiero empezar agradeciéndoselo a mi director de tesis Amancio Carnero. Amancio, eres mi mentor, contigo he aprendido todo lo que sé. He tenido la suerte de aprender contigo incluso en poyata. Gracias por darme esta oportunidad, sabes que nunca te olvidaré.

A Carmen Cuevas directora de I+D en la empresa farmacéutica Pharmamar. Carmen, gracias por la oportunidad que me has brindado, y por tus palabras y consejos amables que me han ayudado a superarme. A Carlos Galmarini por el interés que siempre ha mostrado por el trabajo que aquí presento. A Luis Francisco García por ayudarme a seguir creciendo tanto laboral como personalmente (que vamos hacer no crecí con los chiripitiflauticos). Luis, has estado ahí incluso sin pedírtelo.

Gracias a Juanfe y Carmen. Con vosotros empecé en Majadahonda, y me enseñasteis mil cosas, esos fueron los mejores años que he vivido dentro de este mundo, desde luego gracias a vosotros. Jesús, sólo tú sabes lo importante que esto es para mí. Gracias por tus consejos, por escucharme y por animarme a que se cumpliera mi sueño. La vida es más fácil con gente como tú cerca. Gracias Oli por tu ayuda con el inglés, por tus charlas y palabras de ánimo. Wolf gracias por compartir conmigo este tiempo en el laboratorio.

A mis amigas Lulu y Bea, esto no hubiera sido lo mismo sin vuestro cariño, apoyo y ayuda. A mis compañeros Fernando y Lidia. A los becarios con los que he compartido este camino (Valle, Estrella, Irene y Fabián). Maja y Belén os deseo lo mejor, al final todo llega. A Mer, Maribel, Natasha e Irene hemos compartido poco tiempo pero intenso. Mer tú vela me iluminó el camino.

A los químicos y en particular a David y Paco (Zipi y Zape), entre cigarros y fuegos de artificio que buenos ratos hemos pasado. A mi amiga Lorena son muchos años juntas y aunque nuestros caminos se separen no te olvidaré. A Delfi, esa adorable “rubía” con la que he compartido tantas charlas. A Ana Rodriguez por tus consejos cuando tuve que tomar la decisión de empezar un nuevo camino y porque en este tiempo no he dejado de pensar en tus palabras “termina este proyecto”. A Chitina, es una pena que ya no estés cerca. También al resto de gente del CNIO con los que he compartido proyectos y sueños.

A mis nuevos compañeros que han tenido que sufrir los efectos de mi falta de sueño. Y en especial a Gema y Marta por escucharme, animarme y apoyarme. Marta, ha quedado chula tu foto en la portada. A “ mis chicos” Bea, Sofía, Patri, Guillermo y Maribel, con vosotros es un placer trabajar, sois los mejores. A Olga por hacer todo tan fácil y a Christian por tu ayuda con el inglés, es mi siguiente reto, espero que juntos lo consigamos.

Y fuera de este mundo. A “mis hombrecitos”, mi marido y mi hijo. Toni, para ti mi agradecimiento no tiene límite. Siempre me has apoyado y me has animado para que haga realidad mi sueño, y soy consciente de los sacrificios que ha supuesto. Tú me conoces más que nadie y sabes lo que esto es para mí. Gracias por creer en mí. Marcos mi amor, mama ya ha terminado de escribir el cuento, ahora todo el tiempo es para que disfrutemos juntos.

A mis padres, gracias a vuestra educación me he convertido en la persona que soy, y espero que estéis tan orgullosos de mí como yo lo estoy de vosotros. A mis suegros, siempre me habéis tratado como una hija, y nunca podré agradecerlos lo suficiente vuestra ayuda. A mis hermanos Victor, Cris y David, cuñados Paloma, Jose, Isa e Inma y sobrinas Virgini, Thelma, Valeria y Aitana, y en especial a mi ahijada Claudia con la que tengo tantas cosas en común. Gracias por vuestro cariño, apoyo y consejos. Y a los que no están pero que siempre estarán en nuestro recuerdo.

A mis amigos, entre ellos Iñaki, Silvia, Nerea, Anne, Emi, Nuria, Patri, Jacinto, Nuria y Paula. Chicos esto se terminó y volvemos a estar en el mercado, ya no será tan difícil quedar con nosotros, gracias por vuestra paciencia.

Gracias a todos por estar ahí.

Y por último, quiero recordar a todas esas personas que por desgracia sufren esta terrible enfermedad que es el cáncer, y espero que con su ayuda se pueda algún día combatir sus graves consecuencias.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	ix
ÍNDICE	xiii
RESUMEN.....	xvii
SUMMARY.....	xxi
ABREVIATURAS	xxv
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Necesidad de nuevas opciones terapéuticas.....	3
1.2 La célula como modelo	4
1.2.1 Biología de la célula en cultivo	5
1.2.2 Cultivos celulares continuos.....	7
1.3 Sarcomas.....	10
1.3.1 Alteraciones cromosómicas en sarcomas.	12
1.3.2 Alteraciones moleculares en sarcomas.	13
1.4 Fármacos antineoplásicos.....	17
1.4.1 Quimioterápicos de origen natural	18
1.4.2 Anti-tumorales según su mecanismo de acción	20
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Muestras para el procesamiento en cultivos.	31
3.2 Material de cultivo celular: soportes, sustratos, medios, sueros y aditivos. ..	31
3.3 Técnica de cultivo celular.....	32
3.3.1 Mantenimiento y conservación de los cultivos.....	33
3.4 Análisis citogenético.	33
3.5 Inmunofenotipaje.	33
3.6 Análisis de los niveles de proteínas.	34
3.6.1 Obtención de extractos proteicos.	34
3.6.2 Western blot.....	35
3.6.3 Inmunoprecipitación.	35
3.7 Técnicas de análisis de expresión a nivel de ARN.....	36
3.7.1 Obtención de ARN total.....	36
3.7.2 Transcripción reversa (RT).....	36
3.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
3.7.4 Determinación de la secuencia de p53.	37
3.8 Ensayos para analizar los efectos celulares de los antitumorales.....	39
3.8.1 Citotoxicidad: MTT y Cristal Violeta.	39
3.8.2 Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	39
3.8.3 Doble tinción con yoduro de propidio y anexina.	40
3.8.4 Núcleos apoptóticos.....	40
3.8.5 Ensayo clonogénico.	40
3.9 Transfecciones.	41
3.9.1 Método del fosfato cálcico.	41

3.9.2	ARN de interferencia para p27 ^{KIP1}	41
3.9.3	Infección retroviral.	41
3.10	Ensayos en ratones desnudos	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	Generación de herramientas para estudiar la respuesta a tratamientos quimioterápicos.	45
4.1.1	Establecimiento de líneas celulares.	46
4.1.2	Inmortalización de células epiteliales de mama y ovario procedentes de mujeres portadoras de mutaciones en el gen BRCA.	51
4.1.3	Selección de poblaciones celulares.....	53
4.1.4	Capacidad tumorigénica <i>in vivo</i>	58
4.2	Panel de líneas celulares de sarcoma.....	60
4.2.1	Caracterización citogenética.	61
4.2.2	Caracterización molecular.....	64
4.2.3	Caracterización farmacológica de las líneas de sarcoma.....	71
4.3	Análisis de determinantes de sensibilidad a fármacos	74
4.4	La sensibilidad a Yondelis® correlaciona con la funcionalidad de p53	84
4.4.1	Ensayos de citotoxicidad	84
4.4.2	Evaluación del estatus de p53.....	86
4.5	Los niveles de p27 ^{KIP1} determinan la sensibilidad a Aplidina®	90
4.5.1	Respuesta a Aplidina® de las líneas de sarcoma.....	90
4.5.2	La ausencia de p27 ^{KIP1} incrementa la sensibilidad a Aplidina® en fibroblastos embrionarios murinos.	93
4.5.3	Relación funcional entre los niveles de p27 ^{KIP1} y respuesta a Aplidina®.	95
5	DISCUSIÓN	99
5.1	Panel de líneas celulares mínimamente pasadas.....	101
5.2	Identificación de marcadores de respuesta a fármacos antitumorales.....	103
5.3	Yondelis® y p53.....	104
5.4	Aplidina®.....	107
5.5	Resumen final	108
6	CONCLUSIONES.....	111
7	BIBLIOGRAFÍA	115
8	ANEXO.....	133

RESUMEN

El descubrimiento de los oncogenes, genes supresores de tumores y genes de susceptibilidad ha demostrado que el cáncer está relacionado con cambios en el genoma y en el epigenoma. Sin embargo, existe una gran variabilidad de alteraciones moleculares, inter- e intra-tipos tumorales, que dificulta enormemente el descubrimiento y desarrollo de terapias efectivas, así como la identificación de biomarcadores apropiados para la selección de pacientes. En este trabajo, se han desarrollado paneles de líneas celulares procedentes de diferentes tipos de tumores humanos. Gracias al bajo número de pases en cultivo, estas líneas celulares conservan las características moleculares del tumor original y por tanto, suponen un buen modelo para la realización de estudios farmacogenómicos que pudieran proporcionar información predictiva de respuesta clínica. Con estas líneas celulares, se realizó un estudio comparativo de los perfiles de expresión de diferentes genes comúnmente alterados en cáncer, y su respuesta a diferentes fármacos antitumorales utilizados actualmente en clínica. Asimismo, con la ayuda de herramientas bioinformáticas se han analizado matrices de datos que nos han permitido identificar biomarcadores que puedan predecir la respuesta de las células a diferentes terapias. Una vez validado mediante el análisis de marcadores de respuesta a fármacos previamente descritos en la literatura, el sistema se utilizó para el estudio farmacogenómico de tres compuestos antitumorales de origen marino desarrollados por la empresa biofarmacéutica PharmaMar, que son Yondelis®, Aplidina® y Zalypsis®. Al estudiar la relación entre la respuesta a Yondelis® de las diferentes líneas celulares y los diferentes biomarcadores, observamos que existía una correlación muy significativa entre la alteración de p53 y la sensibilidad a Yondelis®. El análisis posterior con líneas celulares que expresaban o no la proteína p53 funcional, demostró que la ausencia de p53 correlacionaba con una mayor sensibilidad frente al fármaco. Asimismo, demostramos que Yondelis® inducía la acumulación de p53, aunque ésta no se traducía en un aumento en la transcripción de algunos de sus genes diana como p21^{CIP1} o Bax. Por otro lado, se observó una activación de MAPK/ERK dependiente de p53. En relación a Aplidina®, observamos una correlación significativa entre la sensibilidad a Aplidina® y niveles bajos de p27^{KIP1}. Estas mismas líneas celulares con la proteína silenciada o MEFs nulos para p27^{KIP1}, eran mucho más sensibles al tratamiento con Aplidina®. Asimismo, observamos que Aplidina® inducía un incremento de los niveles de la proteína p27^{KIP1}, por un mecanismo dependiente de oxidación, como se demuestra por la inhibición del incremento de los niveles de p27^{KIP1} por la adición de antioxidantes. Por último, en relación a Zalypsis®, hallamos una clara relación entre la sensibilidad al fármaco y bajos niveles del receptor PDGF tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de xenotransplante. Por tanto, se proponen p53, p27^{KIP1} y PDGFRα como biomarcadores predictivos de respuesta a los fármacos Yondelis®, Aplidina® y Zalypsis®, respectivamente.

SUMMARY

The discovery of oncogenes, tumor suppressors and susceptibility genes have demonstrated that cancer is related to changes in the genome. However, the wide variety of molecular alterations observed among inter and intra tumor types greatly difficulties the development of effective anticancer therapies and appropriate biomarkers for the early selection of patients. In this work, we describe the establishment of different panels of cell lines derived from human tumor samples. Due to their low passage number, these cell lines retained part of the molecular characteristics found in the original tumor. This system represented a suitable model to perform pharmacogenomic studies that help to envisage future clinical responses. Using this cell panel, we carried out comparative studies between the expression profiles of different genes commonly altered in cancer and their response to different drugs currently used in clinical oncology. In addition, using validated bio-informatic tools, we generated data matrices that helped us to identify putative response biomarkers for three new marine-derived antitumor drugs - Yondelis®, Aplidin® and Zalypsis® - developed by the Spanish biopharmaceutical company PharmaMar. On studying the relationship between the sensitivity of the different cell lines to Yondelis® and the expression of the selected biomarkers, we observed a highly significant correlation between the presence or absence of p53 and its sensibility to the drug. Dose-response functional analyses using isogenic cell lines expressing or not p53, showed that the absence of p53 consistently increased the sensibility to Yondelis®. In addition, we demonstrated that the drug induced the accumulation of p53, although it was not associated with the transcription of its known target genes Bax or p21^{CIP1}. On the other hand, we observed a p53 dependent MAPK/ERK kinase activation. Concerning Aplidin®, we observed a significant correlation between the cells sensibility to the drug and low expression levels of p27^{KIP1}. Furthermore, cell lines with knocked-down p27^{KIP1} or null MEFs were much more sensitive to Aplidin® than their respective wild-type counterparts. Also, we observed that Aplidin® increased the cellular content of p27^{KIP1} by an oxidation-dependent mechanism, as demonstrated by the inhibition of the Aplidin®-induced increase in p27^{KIP1} levels by the addition of antioxidants. Finally, regarding Zalypsis®, we found a clear relationship between the sensibility to the drug and low levels of PDGFRα in both *in vitro* and *in vivo* in xenotransplantes models. In summary, our results suggest p53, p27^{KIP1} and PDGFRα as predictive response biomarkers for the new antitumor drugs Yondelis®, Aplidin® and Zalypsis®, respectively.

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AKT (PKB): Proteína quinasa B

ALT: Mecanismo alternativo de elongación telomérica

Apaf-1: Factor activador de la proteasa de apoptosis 1

ARN: Acido ribonucleico

ARNi: ARN de interferencia

ARNm: ARN mensajero

ARNsh: ARN que contiene una horquilla

BER: Reparación por escisión de bases

BSA: Albúmina sérica

CAM: Moléculas de adhesión celular

CDK: Quinasa dependiente de ciclina

c-MET: Factor de transición mesenquima-epitelio

CPT-11: Irinotécan

DMEM: Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbeco

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Acido etilen diamino tetracético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

FACS: Citometría de flujo

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GIST: Tumor gastrointestinal estromal.

HBSS: Solución salina equilibrada Hank

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento humano

HR: Recombinación homóloga

hTERT: Subunidad catalítica de la telomerasa

IC50: Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento

IGF-1: Factor de crecimiento de insulina tipo I

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento de insulina tipo I

IP: Yoduro de propidio

JNK: c-Jun N-terminal quinasa

MAPK. Proteína quinasa activada por mitógeno

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MEFs: Fibroblastos embrionarios murinos

MEK: MAPK quinasa

MMR: Sistema de reparación de errores de apareamiento

MPNST: Tumor de la envoltura del nervio periférico

MRN: Complejo que integra las proteínas Mre11, Rad50 y NBS1

NCI: Instituto Nacional del Cáncer

NER: Reparación por escisión de nucleótidos

NHEJ: Mecanismo de reparación por unión de extremos no homólogos

NSCLC: Tumor de pulmón no microcítico

PARP: Poli-ADP-ribosa polimerasa

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento plaquetario

PDGFR: Receptor del factor de crecimiento plaquetario

PI3K: Fosfatidil-inositol 3 quinasa

PIP3: Fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato

PTEN: Fosfatasa y homólogo tensin

RT-PCR: Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa

SBF: Suero bovino fetal

SDS: Dodecil sulfato sódico

SKY: Cariotipo espectral

UV: Radiación ultravioleta

WT: Tipo silvestre

XPB: Xeroderma pigmentosum grupo B

XPD: Xeroderma pigmentosum grupo D

XPB: Xeroderma pigmentosum grupo G

1 INTRODUCCIÓN

1.1 NECESIDAD DE NUEVAS OPCIONES TERAPÉUTICAS.

El cambio de costumbres y el aumento de la longevidad que ha experimentado la especie humana en las últimas décadas han favorecido que el cáncer llegue a afectar a una de cada tres personas (Hanahan et al., 2000). Actualmente, el cáncer es una de las prioridades sanitarias en los países desarrollados.

Los estudios llevados a cabo durante los últimos veinte años han producido avances sustanciales en el conocimiento de los mecanismos genéticos que conducen a la transformación de una célula normal en una célula cancerosa. El descubrimiento de los oncogenes, los genes supresores de tumores y el estudio de los cambios que estas alteraciones genéticas inducen en rutas de señalización celular han demostrado que esta enfermedad está íntimamente relacionada con cambios en el genoma que repercuten en procesos como la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis, la apoptosis y la senescencia celular (Hanahan and Weinberg, 2000).

El cáncer es un término general que engloba una gran variedad de enfermedades, se han descrito al menos 100 tipos distintos de cáncer, y a su vez, muchos de ellos se pueden dividir en varios subtipos. Así, aunque algunas alteraciones moleculares concretas definan determinados tipos de tumores, como por ejemplo el oncogen *ras* en el 90 % de los tumores de páncreas (Abraham et al., 2001), o la translocación BCR-ABL en el 100 % de las leucemias mieloides crónicas (Maru, 2001), en general se dan numerosas alteraciones diferentes en el mismo tipo tumoral entre distintos individuos. Gran parte de estas alteraciones diferenciales (y en muchos tumores, incluso las comunes) son desconocidas y varían entre individuos. Esta gran variabilidad inter e intratipos tumorales dificulta enormemente la búsqueda y validación de marcadores para diagnóstico y especialmente de terapias antitumorales que sean eficientes en el mayor número posible de pacientes.

El número de agentes antitumorales que no progresan con éxito en estudios clínicos supera ampliamente al de compuestos que se muestran eficaces, lo que sugiere que la selección de moléculas en clínica requiere mejoras. El Instituto Nacional del Cáncer, NCI, en Estados Unidos fue pionero en el uso de modelos preclínicos para la selección de quimioterápicos a mitad de los años 50. Las estrategias de cribado de compuestos usadas hasta los años 90 eran esencialmente aloinjertos murinos con énfasis en leucemias. Varios estudios del NCI y de otros grupos demostraron que esta aproximación tenía un bajo valor predictivo de su futuro comportamiento en ensayos clínicos, y que los compuestos encontrados tenían actividad selectiva en leucemias y linfomas, pero no funcionaban en tumores sólidos. Así, en 1990, el NCI introduce un panel de líneas celulares de tumores sólidos humanos con una clara orientación hacia la enfermedad. El panel inicial de líneas celulares incorporaba 60 líneas celulares de diverso origen tisular, incluyendo siete tipos de cánceres (cerebro, colon, leucemias, pulmón, melanoma, ovario y renal). De esta manera se realizó la primera fase de los estudios preclínicos utilizando líneas celulares de varios tumores del mismo origen (Suggitt and Bibby, 2005).

Aproximadamente 85000 compuestos fueron ensayados en el panel de 60 líneas celulares del NCI. Para cada compuesto se generaban perfiles característicos “fingerprints” de respuesta celular, susceptibles de ser comparados entre ellos, y agrupados por sus similitudes o diferencias. Los primeros análisis de los datos generados revelaron que compuestos que tenían perfiles de respuesta semejantes tenían estructuras químicas relacionadas. Además, se pudo comprobar que compuestos con estructuras químicas relacionadas frecuentemente tenían mecanismos de acción similares.

Posteriormente, se incorporó en las bases de datos del NCI gran cantidad de información sobre las características moleculares de las diferentes líneas celulares. Entre otras, niveles de expresión de quinasas, fosfatasas, genes asociados con el control del ciclo celular, apoptosis, reparación del ADN y transducción de señales. El perfil de respuesta específico de cada compuesto en las líneas celulares, junto con el conocimiento de las características moleculares de cada línea, permite asociar la actividad de un compuesto con determinadas alteraciones moleculares (Shoemaker, 2006). De esta forma, los modelos celulares son ampliamente utilizados para el cribado de compuestos, así como para posteriores estudios farmacogenómicos o de mecanismo de acción.

1.2 LA CÉLULA COMO MODELO

La célula es la unidad funcional del ser vivo. Está limitada por una membrana proteico-lipídica que permite el paso selectivo de algunas sustancias manteniendo unas ciertas condiciones en el interior de la misma que hacen posible su funcionamiento y supervivencia. Los requerimientos fisicoquímicos, nutritivos, de crecimiento y de defensa se realizan a través de mecanismos fisiológicos del organismo pluricelular completo. Hace unas decenas de años, se demostró que las células podían extraerse de los tejidos y mantenerse en cultivos en condiciones controladas. Para ello, era necesario reproducir en el laboratorio las necesidades físicas (pH, osmolaridad), las necesidades nutritivas (aminoácidos, purinas y pirimidinas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y coenzimas y sales), factores de crecimiento y medios de defensa frente a posibles infecciones.

En los últimos años la técnica de cultivos celulares ha supuesto un poderoso instrumento analítico para el estudio de fenómenos celulares. El mismo hecho de conseguir que las células de un organismo sobrevivan y se multipliquen en medio artificial ha permitido el conocimiento y, por lo tanto, el control de muchos de los requerimientos y mecanismos que funcionan *in vivo*. Asimismo, los cultivos celulares permiten obtener grandes cantidades de poblaciones de células homogéneas de manera reproducible, por lo que se pueden utilizar como modelos en el estudio de los mecanismos celulares. Además, suponen una economía en el uso de reactivos y compuestos, pues al realizarse los estudios en volúmenes reducidos y con un acceso directo de las células al compuesto las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en el animal completo.

Sin embargo, las diferencias de comportamiento que puede exhibir un mismo tipo celular *in vivo* e *in vitro*, hace que no puedan extrapolarse sin más los resultados obtenidos *in vitro* a la situación real *in vivo*.

1.2.1 BIOLOGÍA DE LA CÉLULA EN CULTIVO

En el proceso de establecimiento de un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios. Así, sólo se mantendrán en cultivo aquellas células que sean, por una parte capaces de superar el proceso de disgregación, y por otra, capaces de adherirse al sustrato y proliferar en forma de monocapa o en suspensión.

El crecimiento en monocapa significa que las células se adhieren al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son dependientes de unión al sustrato y sólo proliferan en condiciones de adherencia. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con pocas excepciones, como las células hematopoyéticas maduras.

Es importante destacar que en todos los tejidos existe una población celular que es capaz de crecer en suspensión cuando se cultiva *in vitro*. A pesar de que su origen no está claro, se cree que se trata de células madre (“cancer stem cells”) indiferenciadas.

Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección: aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se alcanza la confluencia, las células detienen su crecimiento, excepto las células tumorales.

Así pues, se ha de entender el cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a la que estén sometidos.

El crecimiento de las células en cultivo primario prosigue a lo largo de una serie de generaciones o pases característicos de cada tipo celular y condiciones de cultivo. Así, los hepatocitos de adultos no se establecen más que como cultivo primario mientras que las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) permanecen en cultivo de 3 a 9 pases. Sin embargo al final todas ellas entran en fase de senescencia y, si se mantienen los pases seriados, en muerte celular (**Figura 1**).

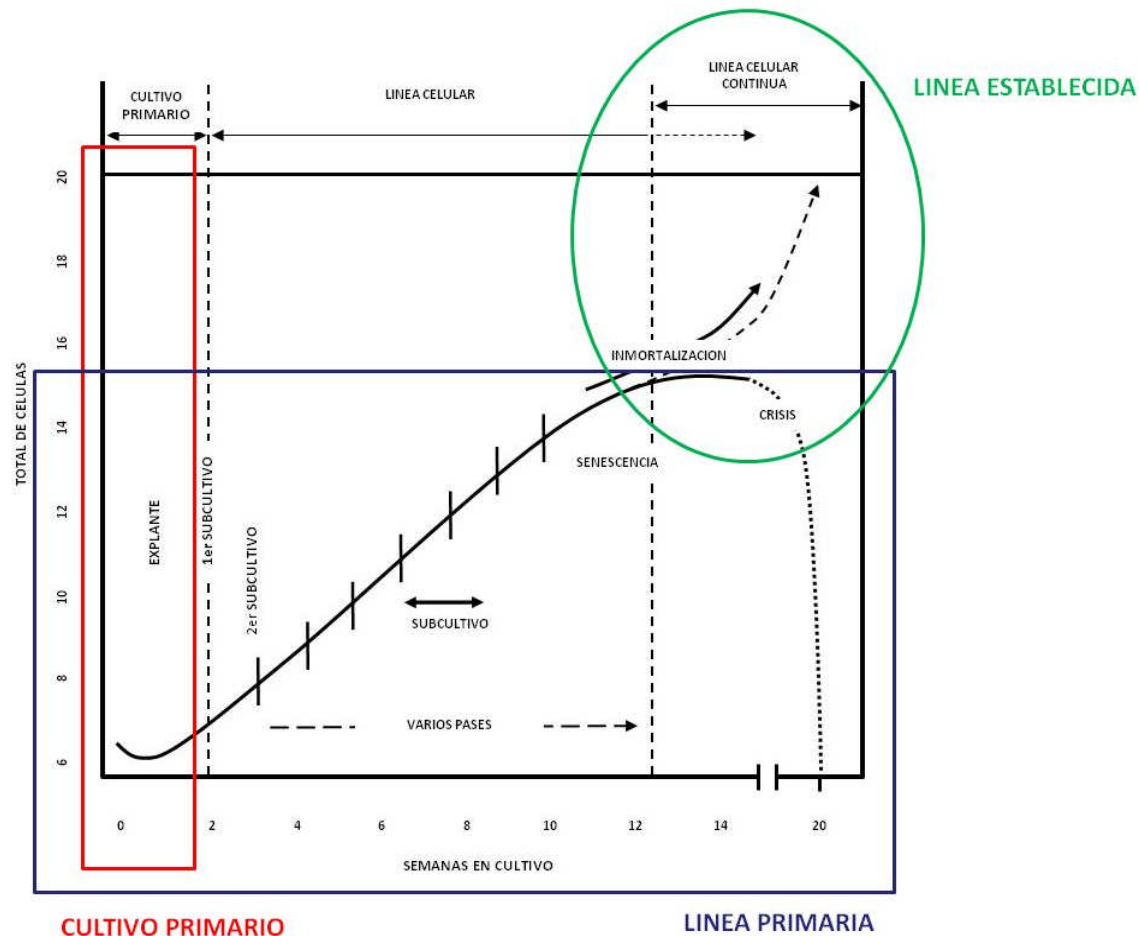


Figura 1. Modelo de evolución de una línea celular hipotética. Comportamiento a lo largo de las semanas. Adaptado de Freshney, 1987, p.8

Ocasionalmente un cultivo primario se mantiene durante más generaciones de las esperadas. Esto es debido a la aparición en el cultivo de células inmortales. Estas células forman líneas estables o cultivos celulares permanentes. La razón de la immortalización de estas células es, en la mayor parte de los casos, la aparición de alteraciones genéticas o epigenéticas. Estas alteraciones pueden incrementarse mediante infecciones virales, tratamientos con mutágenos, etc. Estas alteraciones están relacionadas con la pérdida, espontánea o inducida por el tratamiento, de las vías de control celular. Se hipotetiza que la capacidad de un cultivo celular primario para establecerse como línea estable está relacionado directamente con su variabilidad genética. Así, líneas celulares que nunca se establecen como estables se mantienen euploides (sin alteración de la dotación cromosómica) como es el caso de fibroblastos humanos (Hayflick and Moorhead, 1961), los fibroblastos de pollo (Hay and Paul, 1967), y la glia humana (Blomquist et al., 1980). Otras líneas frecuentemente se convierten en aneuploides (alteración de la dotación cromosómica) y se transforman en líneas celulares continuas con mayor frecuencia, como es el caso de las células epidérmicas (Green et al., 1979; Page et al., 1978).

Los cultivos primarios de muchos tipos celulares son posibles porque las células pierden algunas de sus propiedades de tejido diferenciado, entre ellas la incapacidad de dividirse, y se convierten en células que mantienen tan solo algunas de las propiedades que las caracterizaban en su tejido original. Esta pérdida de propiedades puede ser debida a desdiferenciación o desadaptación. La primera implica una pérdida irreversible de una propiedad diferencial del tipo celular (por ejemplo, un hepatocito en cultivo pierde sus enzimas característicos como arginasa y aminotransferasas, no puede almacenar glucógeno ni sintetizar las proteínas del suero), mientras que la segunda implica que la característica especializada perdida no es irreversible sino consecuencia de la pérdida de la señal (externa, hormonal, nerviosa, etc) y que basta con recuperarla para que se reexprese. Michalopoulos y colaboradores (Michalopoulos and Pitot, 1975; Michalopoulos et al., 1978) demostraron que los hepatocitos de rata pueden reexpresar tirosina aminotransferasa en presencia de ciertas hormonas (insulina e hidrocortisona) cuando crecen sobre una matriz de colágeno.

1.2.2 CULTIVOS CELULARES CONTINUOS.

Como hemos mencionado, el proceso que conduce a la aparición de líneas celulares continuas se denomina comúnmente inmortalización. Podemos diferenciar entre la inmortalización en cultivo que es la adquisición de potencial replicativo ilimitado, y la transformación que además implica alteraciones en las características fenotípicas y de crecimiento. La transformación es un evento particular, o una serie de eventos que dependen de -y/o promueven- la inestabilidad genética. Estas alteraciones pueden inducir una serie de cambios en la célula que proporcionan control aberrante del crecimiento por pérdida de inhibición por contacto, crecimiento independiente de anclaje e independencia a señales de crecimiento. En el proceso subsiguiente, las células adquieren malignidad, es decir desarrollan la capacidad de generar tumores invasivos.

1.2.2.1 INMORTALIZACIÓN.

La inmortalización es un proceso con varias etapas. Hace cuatro décadas, las observaciones de Hayflick establecieron que fibroblastos diploides humanos mostraban una parada en el crecimiento en cultivos continuos. Esta parada no estaba relacionada con el tiempo que las células estaban en cultivo sino con el número de divisiones. Estas observaciones llevaron a formular la hipótesis de que las células somáticas normales tienen un “reloj mitótico” que cuenta el número de divisiones celulares, y que las células pierden su capacidad proliferativa tras un número crítico de divisiones (Hayflick, 1976, 1997; Hayflick and Moorhead, 1961). La máxima capacidad de división en cultivo de células somáticas humanas procedentes de donantes jóvenes oscila entre 50 y 100 duplicaciones, y este límite (conocido como límite de Hayflick) se reduce a medida que la

edad del donante aumenta, presumiblemente debido a la historia replicativa de las células *in vivo*. Cuando una célula normal agota su capacidad de replicación adquiere un estado de senescencia celular asociado a un bloqueo irreversible del crecimiento. Hay ejemplos de células senescentes *in vivo* que pueden residir en el organismo durante varios años, como melanocitos senescentes (Michaloglou et al., 2005), y hay otros ejemplos de células senescentes que son eliminadas rápidamente por fagocitosis, como las células senescentes de carcinomas hepáticos (Xue et al., 2007).

Se ha descrito que el mecanismo que cuenta las divisiones celulares son los telómeros (Harley et al., 1990). Los telómeros son los extremos de los cromosomas formados por ADN altamente repetitivo, y distinguen entre los extremos naturales de los cromosomas y puntos de ruptura, estabilizando a los cromosomas frente a problemas de degradación o recombinación ilegítima. No obstante, los extremos de ADN lineal no pueden ser replicados completamente por el complejo de ADN polimerasa convencional. En ausencia de un mecanismo capaz de compensar este problema de replicación terminal, en cada división celular se pierde ADN telomérico. La erosión sucesiva de los telómeros en cada división celular finalmente resulta en la pérdida de su capacidad para proteger los extremos de los cromosomas y en pérdida de material genético. La mayoría de especies eucariotas utilizan una transcriptasa reversa especializada, la telomerasa, para compensar el problema de replicación terminal y regenerar el ADN telomérico de novo (Morin, 1989). Las células y tejidos normales, que mayoritariamente no tienen actividad telomerasa, experimentan un acortamiento progresivo de los telómeros. En cambio, las células y tejidos germinales, y la mayoría de las líneas celulares humanas inmortalizadas muestran actividad de la telomerasa y una longitud estable de los telómeros. Además, la mayoría de los tumores humanos exhiben actividad telomerasa (Counter et al., 1992; Kim et al., 1994).

Las células somáticas normales, que carecen de actividad telomerasa, en cultivo entran en un estado de senescencia celular o fase de mortalidad M1 (Wright and Shay, 1992). Esta fase probablemente ocurre cuando los telómeros se acortan lo suficiente como para que los extremos distales de los cromosomas dejen de estar totalmente enmascarados y entonces son reconocidos como roturas de doble cadena que necesitan ser reparadas, y en consecuencia activan el gen supresor de tumores p53 dando lugar a células senescentes (de Lange, 2005). Diferentes estudios, usando modelos de células tumorales *in vitro* e *in vivo*, demostraron que con diferentes formas de producir daño al ADN se induce senescencia (Parrinello et al., 2003; te Poele et al., 2002). Estos datos sugieren que el daño al ADN puede ser una causa de senescencia, incluyendo no sólo la disfunción de los telómeros. De hecho, en células senescentes se observa un elevado número de focos de reparación de daño al ADN, identificados por marcajes de fosforilación de las proteínas 53BP1 o γ H2AX (Ruiz et al., 2008).

La senescencia de las células en cultivo puede superarse mediante la inactivación de las rutas de p53 y pRb como se demostró introduciendo oncoproteínas virales como el

antígeno T de SV40 que inactiva ambas rutas (Shay et al., 1991), o introduciendo oncoproteínas que inactivan cada ruta por separado como E6 o E7 (Bond et al., 1999). P16^{INK4a} se ha investigado como factor que pueda explicar la senescencia celular. Se observó que los niveles de p16^{INK4a} aumentan progresivamente durante la historia proliferativa de las células en cultivo (Collado et al., 2007). Asimismo, se ha podido observar que la expresión de p16^{INK4a} y ARF se incrementa con la edad en la mayoría de los tejidos de roedores (Krishnamurthy et al., 2004). Estudios realizados en tejidos humanos, han detectado un claro incremento de los niveles de p16^{INK4a} producido por la edad (Chkhotua et al., 2003; Ressler et al., 2006). Sin embargo, los mecanismos responsables de este incremento de expresión no se conocen con exactitud.

La senescencia de células en cultivo puede superarse, aumentando de forma limitada su capacidad replicativa hasta que entran en una segunda fase de mortalidad denominada crisis (M2). La fase de crisis se caracteriza por muerte celular masiva, alteraciones cariotípicas asociadas a fusiones cromosómicas, apoptosis y a la aparición ocasional (~ 1 en 10^7) de células que hayan adquirido un potencial replicativo indefinido (inmortalidad).

1.2.2.2 CONTROL ABERRANTE DEL CRECIMIENTO.

Las células normales necesitan señales de crecimiento para pasar de un estado quiescente a un estado de proliferación activo. Sin embargo, las células transformadas suelen tener poca dependencia de factores de crecimiento y tienen control de crecimiento autónomo por sobreexpresión de oncogenes o por delección de genes supresores. Asimismo, secretan mitógenos para los cuales tienen receptores (respuesta autocrina) que a su vez, pueden estar permanentemente activos o desregulados. En las células inmortalizadas no es necesaria la pérdida del control del crecimiento.

La dependencia de unión al sustrato es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células normales en cultivo. Sin embargo, una de las propiedades asociadas con la transformación es el resultado de modificaciones en la expresión de proteínas de membrana que pueden contribuir a disminuir las interacciones célula-célula o célula-sustrato y de esta forma no depender del anclaje para proliferar. Además, la pérdida del reconocimiento célula-célula produce una reducción de la adhesión que conduce a la desorganización de patrones de crecimiento y pérdida de la inhibición por contacto y limitación de la proliferación celular por confluencia.

La transformación es una característica claramente observable en células tumorales en cultivo a diferencia de fibroblastos infiltrados, células procedentes de vasos sanguíneos o células inflamatorias.

Las líneas celulares derivadas de tumores malignos pueden tener diferentes grados de transformación sugiriendo que ocurre en una serie de etapas no necesariamente coordinadas o interdependientes. Además todos los linajes celulares presentes en un

tumor no necesitan tener las mismas propiedades transformantes y el mismo conjunto de propiedades transformantes no están necesariamente expresadas en todos los tumores. Por lo tanto, la progresión puede implicar la expresión de nuevas propiedades o la pérdida de algunas que puede inducir a metástasis o remisión espontánea.

La transformación es un proceso con varias etapas y la secuencia en que se produce puede estar determinada por la presión selectiva del ambiente. *In vitro* las pequeñas restricciones impuestas en el crecimiento, hace que los eventos no se produzcan necesariamente en el mismo orden que *in vivo*.

Durante el desarrollo tumoral muchas células escapan del tumor primario, y transportadas por la sangre o la linfa invaden tejidos y órganos distantes (Fidler, 2002; Kurschat and Mauch, 2000). alguna de las propiedades asociadas con la transformación neoplásica *in vitro* son el resultado de modificaciones en la superficie de las células (ej: alteración de moléculas de adhesión célula-célula (CAMs) e integrinas que pueden estar relacionadas con la invasión y metástasis *in vivo*.

1.3 SARCOMAS

Básicamente, los tumores se pueden clasificar en función de dos características: su lugar de origen (pulmón, mama, próstata, etc) y por el tejido o la célula del que proceden. De acuerdo con esto, los tumores se dividen en:

- Carcinomas: se originan en los epitelios. Son los tejidos que revisten las cavidades y los conductos del cuerpo. También son epitelios las glándulas, que se encargan de segregar sustancias. A los tumores que proceden de glándulas se les denomina adenocarcinomas.
- Sarcomas: proceden del tejido conectivo y sus derivados. Como el tejido conjuntivo se encuentra en todo el cuerpo, estos tumores pueden aparecer en cualquier parte.
- Leucemias y linfomas: se originan en las células hematopoyéticas de la médula ósea en el caso de las leucemias y en los nódulos linfáticos en los linfomas.
- Melanomas: se originan de las células de la piel llamadas melanocitos. Los melanocitos proceden de la cresta neural. Son muy diferentes a los carcinomas en cuanto a su comportamiento.
- Tumores del sistema nervioso central: La mayoría de ellos pertenecen al grupo de los gliomas, aunque, a pesar de ser poco frecuentes, la variedad es muy amplia.

En este trabajo nos centramos en el estudio de sarcomas por lo que pasamos a describir con mayor detalle estos tipos de tumores.

Los sarcomas en general constituyen menos del 5% de las neoplasias de adultos, y del 20% de los tumores pediátricos. Estos tumores derivan de la capa germinal mesodérmica, a diferencia de los carcinomas que derivan normalmente del endodermo.

Los sarcomas tradicionalmente se dividen en dos grupos:

- Sarcomas de tejido blando. Son tumores que se generan a partir de tejido de soporte. Pueden ocurrir en tejido adiposo, músculo, nervios, tendones, articulaciones, vasos sanguíneos y vasos linfáticos.
- Tumores de hueso. Se generan a partir de tejido óseo (osteosarcomas) o de tejido cartilaginoso (condrosarcomas). Los tumores primarios son poco frecuentes, siendo más normal la metástasis ósea de carcinomas y mielomas.

Recientemente se han identificado alteraciones moleculares asociadas con subtipos histológicos específicos de sarcomas indicando que clasificaciones previas basadas en el sitio del tumor (hueso o tejidos blandos) son tan importantes como las características moleculares/patológicas. Esto ha sido especialmente importante en la búsqueda de tratamientos que son particularmente eficaces en pacientes con sarcomas específicos. Por ejemplo, se ha descrito que el fibrosarcoma congénito y el nefroma mesoblástico tienen el mismo origen genético indicando que son el mismo tumor que evoluciona en diferente localización. Esto ha tenido un gran impacto en la búsqueda de tratamientos para estos tipos de tumores ya que mientras que los tumores epiteliales son definidos por el órgano de origen, los sarcomas son definidos por su patología molecular (Helman and Meltzer, 2003).

En general, la etiología de estos tumores no es bien conocida ya que la mayoría de los sarcomas ocurren por mutaciones espontáneas. Sin embargo hay varios síndromes de cáncer familiar asociados a sarcomas. Pacientes con mutaciones germinales del gen *retinoblastoma* (Rb) sufren con mayor frecuencia osteosarcomas (Abramson et al., 1984). Pacientes con el síndrome Li-Fraumeni con mutaciones germinales de p53 tienen mayor incidencia de padecer varios tipos de sarcomas después de los 45 años (Li and Fraumeni, 1969; Malkin et al., 1990). Otro sarcoma, el tumor de la envoltura del nervio periférico (MPNST), esta asociado con la pérdida germinal del gen NF1 (King et al., 2000). Finalmente, el tumor gastrointestinal estromal (GIST) esta relacionado con la mutación germinal de c-Kit (Nishida et al., 1998).

En la actualidad, la cirugía es la solución más común en la mayoría de los sarcomas. En pacientes con tumores irresecables o que tienen tumores residuales se emplea frecuentemente radioterapia. Los pacientes con metástasis son tratados con quimioterapia sistémica siendo la doxorubicina y la ifosfamida los fármacos más usados. En subtipos específicos se usan gemcitabina (leiomioma sarcoma), paclitaxel, vinorelbina (angiosarcoma), cisplatino o metotrexato (osteosarcoma) (Fayette and Blay, 2006). Estos tratamientos han sido efectivos en pacientes que tienen tumores localizados, en los que

ha aumentado la esperanza de vida. Desde septiembre del 2007 Yondelis® un compuesto antitumoral de origen marino se utiliza en el tratamiento de sarcomas de tejido blando avanzado o metastático. Sin embargo, para algunos tumores que no responden a la terapia y en pacientes con metástasis, son necesarias nuevas opciones terapéuticas

1.3.1 ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN SARCOMAS.

Un avance reciente en la comprensión de los sarcomas ha sido la identificación de anomalías cromosómicas asociadas a determinados subtipos histológicos específicos de sarcomas (**Tabla 1**). Existen dos grupos en función de sus características cariotípicas (Lazar et al., 2006; Mackall et al., 2002; Osuna and de Alava, 2009).

El primer grupo está caracterizado por un cariotipo caótico y ausencia de fusiones de genes. En éste grupo se encuentran los leiomiomasarcomas y los osteosarcomas.

El segundo grupo está formado por sarcomas que tienen translocaciones cromosómicas que dan lugar a la formación de genes de fusión. Estas translocaciones unen dominios funcionales de las dos proteínas implicadas, creando nuevos productos génicos con propiedades funcionales alteradas (Tomescu and Barr, 2001). Diferentes estudios han demostrado que estos genes de fusión pueden dar lugar a quimeras implicadas en resistencia a la apoptosis (Li and Fraumeni, 1969; Yi et al., 1997), aumento de la capacidad proliferativa (May et al., 1993), e inhibición de diferenciación terminal (Kuroda et al., 1997).

Está claro que las translocaciones son necesarias para la tumorigénesis pero pueden ser insuficientes para la transformación maligna (Mackall et al., 2002).

Tabla 1: Alteraciones genéticas comunes encontradas en sarcomas

Tipo de tumor	Translocación	Genes	Tipo de Fusión	Prevalencia
Sarcoma de Ewing	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	Factor de transcripción	95
	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	Factor de transcripción	5
	t(7;22)(p22;q12)	EWS-ETV1	Factor de transcripción	<1
	t(2;22)(q33;q12)	EWS-E1AF	Factor de transcripción	<1
	t(1;22)(q42;q12)	EWS- ϵ		<1
	t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV	Factor de transcripción	<1
	t(17;22)(q12;q12)	EWS-ETV4		
	t(6;22)(p21;q12)	EWS-POU5F1	Factor de transcripción	ϵ
Liposarcoma mixoide	t(12;16)(q13;p11)	FUS-CHOP	Factor de transcripción	95
	t(12;22)(q13;q12)	EWS-CHOP	Factor de transcripción	5
Condrosarcoma mixoide	t(9;22)(q22;q12)	EWS-CHN(TEC)	Factor de Tanscripción	75
Sarcoma Sinovial	t(X;18)(p11.23;q11)	SS18-SSX1	Factor de Tanscripción	65
	t(X;18)(p11.21;q11)	SS18-SSX2	Factor de Tanscripción	35
	t(X;18)(p11;q11)	SS18-SSX4	Factor de Tanscripción	
	t(X;20)(p11;q13.3)	SS18L1-SSX1	Factor de Tanscripción	
Sarcoma de células clara	t(12;12)(q13;q21)	EWS-CREB1	Factor de Tanscripción	91
Rabdomiosarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FKHR	Factor de Tanscripción	75
	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FKHR	Factor de Tanscripción	10
	t(2;2)(q35;p23)	PAX3-NCOA1	Factor de Tanscripción	
Dermatofibrosarcoma	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	Factor de Crecimiento	
Fibrosacoma congénito	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3		
Sarcoma Alveolar	t(X;17)(p11;q25)	TFE3-ASPL	Factor de Tanscripción	
Sarcoma estromal endometrial	t(7;17)(p15;21)	JAZF1-JJAZF1	Factor de Tanscripción	

1.3.2 ALTERACIONES MOLECULARES EN SARCOMAS.

Se han identificado sarcomas que no presentan alteraciones cromosómicas evidentes o si las tienen no han sido identificadas como causales de la enfermedad. Esto lleva a plantearse la existencia de alteraciones moleculares (mutaciones, metilación de promotores, pequeñas deleciones, sobreexpresión de mensajeros o proteínas, etc) como origen de la tumorigenicidad.

Este tipo de alteraciones moleculares ocurren en muchos sarcomas, algunas compartidas con otros tipos de cáncer, con otros tipos de sarcomas o pueden ser específicas de un tipo particular de sarcoma. Es importante comprender e identificar cada tipo de alteración ya que en la búsqueda de nuevas terapias es vital conocer si se puede aplicar a varios cánceres o es más específica de un subtipo de sarcoma.

1.3.2.1 GENES IMPLICADOS EN CICLO CELULAR.

La mayoría de las células de tejidos adultos se encuentran en estado quiescente. Las células tumorales presentan proliferación incontrolada a pesar de que la mayoría de los tumores se originan a partir de tejidos adultos. Por lo tanto, la ventaja proliferativa de las células tumorales surge de su capacidad de evadir el estado de quiescencia.

La función del gen supresor de tumores *retinoblastoma* (Rb) consiste en bloquear la entrada de las células en la fase S de síntesis de ADN del ciclo celular (Weinberg, 1995). La función del producto del gen pRb es regulada por una serie de quinasas e inhibidores de quinasas que pueden verse como reguladores del ciclo celular permitiendo su progresión o induciendo su parada. La sobreexpresión de ciclina D1, la pérdida de expresión de pRb o de p16^{INK4a} son alteraciones normalmente presentes en muchos tipos de cánceres. Los sarcomas no son una excepción, y más del 50% de varios tipos de sarcomas han perdido la expresión de al menos uno de estos genes (Cohen and Geradts, 1997; Sabah et al., 2006).

La proteína p53 actúa como un sensor de daño al ADN o estrés celular (Levine, 1997). Es un factor de transcripción nuclear que inhibe la proliferación celular por activación de p21^{Cip1}, lo que causa parada en G1 del ciclo celular (Cordon-Cardo, 1995; Harris et al., 1996). p53 es regulada por MDM2 y ARF. MDM2 inhibe la actividad de p53 mientras que ARF inhibe a MDM2. La sobreexpresión de MDM2, la pérdida de ARF o la pérdida de actividad de p53 son frecuentes en muchos cánceres incluidos los sarcomas. En diversos tipos de sarcomas más del 60% de los tumores presentan alguna mutación inactivante de p53 (Creager et al., 2001). Además la amplificación de MDM2 ocurre con mayor frecuencia en sarcomas que en otros tipos de cánceres (Leach et al., 1993).

1.3.2.2 ALTERACIONES EN LA RUTA DE SEÑALES DE CRECIMIENTO

Como en otros tipos de tumores, en sarcomas se han descrito anormalidades en rutas de señalización de factores de crecimiento. En sarcomas las rutas que se han visto activadas son: el receptor IGF-1 en rabdomiosarcoma y leiomiomasarcoma (Deitel et al., 2002), FDGFR en osteosarcomas (McGary et al., 2002), c-Kit en sarcomas de Ewing's y GISTs (Berman and O'Leary, 2001; Hornick and Fletcher, 2002; Merchant et al., 2002; Rubin et al., 2001) y c-MET en sarcoma sinovial y rabdomiosarcoma (Ferracini et al., 1996; Tamborini et al., 2001; Wallenius et al., 2000). En muchos casos, la activación de estas rutas no es debida directamente a alteraciones genéticas específicas del tumor sino que contribuyen a la patogénesis de estos tumores por efectos mitogénicos y anti-apoptóticos. Un punto convergente en la señalización de estos receptores es la activación de la ruta PI3K-AKT, que tiene un potente efecto anti-apoptótico. La activación de la vía de PI3K puede ocurrir por activación de receptores pero también por pérdida de PTEN, mutaciones activantes

en la subunidad catalítica de PI3K o amplificaciones del gen que codifica para dicha subunidad.

1.3.2.3 GENES IMPLICADOS EN APOPTOSIS

La apoptosis (muerte celular programada) es una forma de muerte celular morfológicamente reconocible y ejecutada mediante un mecanismo conservado a lo largo de la evolución, desde nematodos a humanos (Hengartner, 2000). Se piensa que fallos en las rutas de apoptosis contribuyen a la tumorigénesis de todos o casi todos los tipos de cáncer (Evan and Vousden, 2001; Hanahan and Weinberg, 2000). La desregulación de los programas apoptóticos crea un ambiente permisivo para la inestabilidad genética y la acumulación de mutaciones, proporcionando resistencia a la eliminación ejercida por el sistema inmune, facilitando el escape a los puntos de control del ciclo celular y facilitando la supervivencia celular independiente de factores de crecimiento u hormonas, reduciendo la dependencia de oxígeno y nutrientes y confiriendo resistencia a la radiación y a los efectos citotóxicos de fármacos anticancerosos. El proceso de apoptosis está estrechamente regulado y se ha demostrado que varias rutas de señalización impactan sobre el potencial apoptótico de las células, especialmente la ruta PI3K/AKT (Cantley and Neel, 1999).

AKT es una serina/treonina quinasa, que está implicada en una gran variedad de respuestas biológicas como el metabolismo de glucosa, proliferación celular, apoptosis, transcripción y migración celular (Alessi and Downes, 1998; Cross et al., 1995; Hemmings, 1997; Medema et al., 2000; Scheid and Woodgett, 2001). La desregulación de AKT se ha visto que está implicada en la evolución del cánceres humanos (Brazil and Hemmings, 2001). AKT se encuentra permanentemente activa en muchos tipos de tumores (Nicholson and Anderson, 2002). Esta activación promueve la supervivencia y proliferación contribuyendo a la progresión del tumor.

AKT se activa por un mecanismo que requiere la unión a PIP3 para su translocación a la membrana plasmática donde PDK1 la fosforila en treonina 308 que activa parcialmente AKT. No obstante para su activación total requiere fosforilación en serina 473 (Downward, 1998). El estado de activación de AKT puede predecir la progresión y pronóstico de sarcomas de tejidos blandos (Downward, 1998). Se ha descrito la activación constitutiva de AKT en líneas celulares de rhabdomyosarcomas (Wan and Helman, 2003) y en pacientes con sarcoma de Kaposi (Sodhi et al., 2004).

PTEN es una fosfatasa que desfosforila PIP3 inhibiendo AKT y funcionando como un gen supresor de tumores. PTEN está mutada o delecionada en una gran variedad de tumores humanos (Li et al., 1997; Steck et al., 1997). PTEN actúa como un regulador negativo de AKT y regula el balance entre crecimiento celular y muerte.

PTEN, *retinoblastoma*, p53 y p19^{ARF} son genes supresores de tumores que regulan la apoptosis impidiendo la activación de caspasas por diversos mecanismos. pRB inhibe la apoptosis induciendo Bcl-X. P53 produce apoptosis a través de la activación del gen pro-apoptótico Bax, y a través de mecanismos que requieren Apaf-1 y caspasa 9. El gen supresor de tumores p19^{ARF} induce apoptosis por la unión a MDM2 y evitando la degradación de p53 (Macleod, 2000). La pérdida de Apaf-1 y caspasa 9 incrementa la tumorigénesis.

1.3.2.4 GENES DE ESTABILIDAD GENÓMICA

Una tercera clase de genes que están implicados en cáncer, se les denomina genes de estabilidad. Son los genes que participan en la reparación del ADN, estos genes codifican proteínas cuya función normal es corregir errores que surgen cuando las células duplican el ADN antes de dividirse.

Las mutaciones en los genes reparadores de ADN pueden conducir al fracaso en la reparación de ADN lo cual a su vez permite que mutaciones subsecuentes se acumulen. Esta clase de genes son los pertenecientes a los sistemas de reparación de errores de apareamiento (MMR), reparación por escisión de nucleótidos (NER) y reparación de la escisión de bases (BER) (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Defectos en MMR por mutaciones espontáneas conducen a la tumorigénesis y son marcadores de inestabilidad genética (Garcia et al., 2006). Los dos componentes principales del sistema de reparación MMR son MSH2 y MLH1. Su estructura y función esta muy conservada a lo largo de la evolución. Una unión directa entre deficiencia en MSH2 o MLH1 y tumorigénesis se demuestra en ratones deficientes en MSH2 y deficiencia de MLH1 en humanos. Los ratones deficientes en MSH2 desarrollan tumores linfáticos. Deficiencia en MLH1 en humanos predispone a transformación maligna hematológica. Además, está totalmente aceptado que mutaciones en los genes MSH2 y MLH1 están involucrados en el carcinoma colorectal no poliposo hereditario (Park et al., 1999; Stormorken et al., 2005). Asimismo, la reducción de la expresión de MSH2 se ha asociado con peor pronóstico en algunos grupos de sarcomas (Taubert et al., 2003). La inactivación de MLH1 o MSH2 puede estar relacionada con aparición de microsatélites en algunos tipos de sarcomas (Kawaguchi et al., 2005).

1.3.2.5 OTROS GENES ALTERADOS EN CÁNCER.

Es conocido que la proteína β -catenina es importante en dos rutas que están frecuentemente alteradas en cáncer. Por un lado, la adhesión entre células es importante para mantener la arquitectura de los tejidos. Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión. Estas proteínas están vinculadas con el citoesqueleto a través de las proteínas llamadas cateninas. En estudios previos se ha puesto de manifiesto que la pérdida de adhesión incrementa la capacidad de invasión de las células tumorales, esto está asociado con la rotura de la unión célula-célula mediada por las alteraciones de la fosforilación del complejo E-cadherina- β -catenina (Yoo et al., 2002).

Por otra parte, β -catenina tiene un segundo papel en la evolución de los tumores porque forma parte de la ruta de Wnt que regula la proliferación celular y la diferenciación. Los niveles de β -catenina en la célula, en ausencia de Wnt, están controlados por un complejo que incluye APC y GSK3 β . Mediante la fosforilación de β -catenina por GSK3 β en el complejo promueve la degradación de β -catenina vía proteosoma. La activación de la ruta de Wnt hace que GSK3 β se inactive, y aumenten los niveles de β -catenina libre, que entonces se transloca al núcleo y funciona como un factor de transcripción, activando genes como *c-Myc*, *Fcf1* y *ciclina D1* (Ng et al., 2005).

La importancia de la ruta Wnt/ β -catenina se ha descrito en varios tipos de tumores, sobre todo en la evolución del carcinoma colorectal y en otros carcinomas. La desregulación de esta ruta también se ha descrito en sarcoma sinovial, osteosarcoma, liposarcoma y en fibrohistocitoma fibroso maligno (Haydon et al., 2002; Saito et al., 2002; Sakamoto et al., 2002). La localización nuclear de β -catenina correlaciona con progresión tumoral determinado por la actividad proliferativa o peor pronóstico en sarcomas de tejido blando (Saito et al., 2006).

1.4 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS.

El objetivo de las terapias farmacológicas actuales contra el cáncer consiste en reducir el número de células tumorales y en evitar su progresiva acumulación. Sin embargo, ciertos tipos de cáncer no responden o se hacen resistentes a los tratamientos anti-tumorales convencionales, lo que hace necesario el descubrimiento de nuevos agentes quimioterápicos con estructura y mecanismo de acción innovadores para conseguir un tratamiento más eficaz contra este grupo de enfermedades.

1.4.1 QUIMIOTERÁPICOS DE ORIGEN NATURAL

En la actualidad, la gran mayoría de medicinas en uso terapéutico proceden de productos naturales, como plantas, animales terrestres y microorganismos o son derivados de ellos (da Rocha et al., 2001). Esta afirmación es aún más significativa en el ámbito de la oncología, donde ciertos fármacos anti-tumorales de origen natural (antraciclinas, alcaloides de la vinca, camptotecinas, etc), han sido y son la base de la quimioterapia actual desde hace 30 años (**Tabla 2**). Más del 50% de los medicamentos que están siendo objeto de estudio clínico para los múltiples tipos de cáncer son también productos naturales o sus derivados (Newman et al., 2003).

Tabla 2: Quimioterápicos de origen natural

COMPUESTO	ORIGEN	EFFECTO BIOLÓGICO
Paclitaxel (Taxol)	Raíces de <i>Taxus brevifolia</i>	Estabilizador de microtúbulos
Vincristina (Oncovin)	Hojas de <i>Vinca rosea</i>	Desestabilizador de microtúbulos
Irinotecan/CPT-11 (Camptosar)	Hojas de <i>Camptotheca acuminata</i>	Inhibidor de Topoisomerasa I
Etoposido (Vepesid)	Raíces de <i>Podophyllum peltatum</i>	Inhibidor de Topoisomerasa II
Doxorubicina (Adriamycin)	Bacteria <i>Streptomyces peucetius</i>	Antibiótico antitumoral (ADN)
Bleomycina (Blenoxane)	Bacteria <i>Streptomyces verticillius</i>	Antibiótico antitumoral (ADN)
Mitomycina C (Mutamicin)	Bacteria <i>Streptomyces caespitosus</i>	Antibiótico antitumoral (ADN)

El descubrimiento en los años 50 de compuestos de origen vegetal, como etopósido y tenipósido, podophilinas aisladas de la planta *Podophyllum peltatum* (usados para el cáncer de piel), y los alcaloides vinblastina y vincristina, aislados de la planta *Vinca rosea* (utilizados en numerosos tipos de cáncer), inspiraron al Instituto Nacional del Cáncer (NCI) para poner en marcha un programa masivo de cribado antitumoral. Entre 1960 y 1982 se evaluaron más de 35000 muestras de plantas terrestres. El éxito más significativo del programa fue sin duda el descubrimiento de taxol, procedente de la corteza del tejo (*Taxus brevifolia*), en 1967. Veinte años después, el taxol se mostró muy efectivo frente a cánceres refractarios de mama y ovario. Hoy en día, sigue siendo el compuesto estrella entre los antitumorales. El esfuerzo continuado por conseguir nuevas moléculas antitumorales de origen natural se ve reflejado en la creciente cartera de candidatos en diferentes fases de ensayos clínicos (Mann, 2002)(**Tabla 3**).

Tabla 3: Nuevos compuestos candidatos de origen natural

COMPUESTO	ORIGEN	EFFECTO BIOLÓGICO
Ara C (Cytosina arabinoside)	Derivado de <i>Cryptoteca crypta</i>	Antimetabolito
Epothilonas	<i>Sorangium Cellulosum</i>	Estabilizador de microtúbulos
Sarcodictyinas	<i>Sarcodictyon roseum</i> (coral)	Estabilizador de microtúbulos
Eleutherobin	<i>Elutherobia</i> sp (coral)	Estabilizador de microtúbulos
Bryostatina 1	<i>Bugula neritina</i> (briozoo)	Apoptosis
Fumagillina	<i>Aspergillus fumigatus</i> (hongo)	Anti-angiogénico
Combretastatinas	<i>Combretum caffrum</i>	Anti-angiogénico
Radicol	<i>Monocillium nordinii</i> (microparasito)	Inhibidor de Raf (Hsp-90)
Lavendustina	<i>Streptomyces griseolavendus</i>	Inhibidor EGFR-TK
Staurosporinas	<i>Streptomyces</i> sp	Inhibidor TK y angiogénesis
Quindolina	<i>Cryptolepsis sanguinolenta</i>	Inhibidor telomerasa

Los océanos del planeta, ocupando más del 70% de la superficie terrestre, contienen una diversidad biológica extraordinaria. A lo largo de la evolución, los invertebrados marinos han desarrollado complejos mecanismos de adaptación y supervivencia, generalmente asociados a la producción de una amplia gama de entidades químicas únicas, que sustituyen la ausencia de un mecanismo inmune protector similar al de los organismos superiores.

Sin embargo, debido principalmente a problemas técnicos, el estudio de compuestos marinos ha sido prácticamente inexistente hasta mediados de la década de los 60. Con el desarrollo y la mejora de las técnicas de exploración submarina ha crecido exponencialmente el conocimiento de los organismos marinos en términos de bio- y quimio-diversidad. Desde entonces se han aislado más de 12.000 nuevas estructuras químicas de microorganismos y macroorganismos marinos incluyendo corales, briozoos, equinodermos, esponjas, tunicados, moluscos, etc. A pesar de la reciente historia de la investigación en productos marinos, los resultados obtenidos en tan sólo las últimas dos décadas avalan a esta fuente natural. Yondelis® (ET-743; Trabectedin), desarrollada por PharmaMar es la primera molécula antitumoral de origen marino aprobada para uso clínico. Yondelis® es utilizada actualmente en el tratamiento de sarcomas de tejidos blandos.

1.4.2 ANTI-TUMORALES SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN

Los principales medicamentos usados en quimioterapia hoy en día siguen siendo compuestos citotóxicos que afectan procesos celulares generales (ADN, tubulina, topoisomerasas, etc) importantes para la vida de la célula. Los más utilizados son:

- Antimetabolitos: Inhiben la síntesis de los precursores del ácido nucleico, por su homología con las bases púricas o pirimidínicas.
- Alquilantes: Establecen enlaces covalentes mediante radicales alquilo con moléculas nucleofílicas como los ácidos nucleicos, dando lugar a la formación de puentes intra o intercatenarios de la hélice de ADN.
- Inhibidores de Topoisomerasas. Las topoisomerasas son enzimas celulares que liberan las torsiones del ADN durante procesos de replicación, reparación, etc.
- Antibióticos: Se intercalan entre las bases del ADN.
- Agentes antimicrotúbulos. Inhiben la dinámica del sistema microtubular.

1.4.2.1 ANTIMETABOLITOS

Los antimetabolitos son análogos estructurales sintéticos de sustancias que existen en la naturaleza, y cumplen funciones esenciales en el metabolismo de las células en división. La estructura de los antimetabolitos difiere muy poco de sus equivalentes normales, de modo que compiten con éstos mediante una variedad de mecanismos que interfieren con sus funciones específicas: en la síntesis de las bases pirimidínicas y purínicas, en la unión de éstas en nucleósidos o en su incorporación a la cadena de ADN. Estos procesos producen bloqueo en la fase S del ciclo celular, de modo que las células afectadas no se dividen y a menudo mueren.

Dentro de este grupo se encuentran los análogos de pirimidinas como 5-fluoropirimidinas, citarabina, gemcitabina, etc. Los análogos de purinas como pentostatin, fludarabina fosfato, cladribina, 6-tiopurina, etc. También análogos del ácido fólico como el metotrexato.

La gemcitabina (dFdC) es metabolizada intracelularmente a nucleósido difosfato (dFdCDP) y trifosfato (dFdCTP), ambos con actividad citotóxica por inhibición de la síntesis de ADN (mediante la inhibición de la ribonucleótido reductasa, y la competición con otros nucleósidos en la incorporación al ADN), lo que parece inducir apoptosis (Di Paolo et al., 2004). Asimismo, una pequeña cantidad de gemcitabina también puede incorporarse al ARN.

Gemcitabina se usa en la actualidad en clínica para tumores avanzados de vejiga, ovario, mama, pulmón y páncreas. Se usa en monoterapia o en combinación con cisplatino,

carboplatino, paclitaxel o 5-fluorouracilo (Comella et al., 2007; Palmeri et al., 2006; Ryan et al., 2006; Stadler et al., 2006).

1.4.2.2 ALQUILANTES

Durante la segunda guerra mundial, al estudiar los efectos tóxicos de los gases mostaza, Gilman y Philips demostraron las propiedades antineoplásicas de estas sustancias en linfomas, iniciando la época de la moderna quimioterapia.

Sus efectos citotóxicos y quimioterapéuticos están relacionados directamente con la alquilación del ADN, interfiriendo con la integridad y función del ADN en tejidos que proliferan rápidamente. Dentro de este grupo se encuentran los derivados de mostaza nitrogenada clorambucilo, ciclofosfamida, melfalan, mecloretamina, estramustina, manomustina, prednimustina, peptiquimio. También los derivados de etileneiminas, derivados del alquil sulfonatos, nitrosureas y derivados de triazenos.

Además, hay otros compuestos como cisplatino que es un complejo metálico pesado, que contiene un átomo central de platino rodeado por dos átomos de cloro y dos moléculas de amonio en posición *cis*. Sus propiedades bioquímicas son similares a los agentes alquilantes bifuncionales, y por tanto su mecanismo de acción produce fundamentalmente en el ADN enlaces cruzados inter e intracatenarios. Cisplatino es uno de los compuestos más efectivos usados en la actualidad en clínica. Se utiliza para cáncer de ovario, testículo, cuello, vejiga y pulmón. Pero los pacientes pueden desarrollar resistencia o puede tener efecto nefrotóxico (Siddik, 2002). Se han desarrollado varios análogos con menos efectos tóxicos como el oxaliplatino (Faivre et al., 1999a; Faivre et al., 1999b).

1.4.2.3 INHIBIDORES DE TOPOISOMERASAS

La replicación, reparación y recombinación del ADN son mecanismos esenciales para la supervivencia de las células. Las topoisomerasas están localizadas en el núcleo de la célula y su función es prevenir superenrollamientos del ADN durante la replicación, transcripción, recombinación y reparación. Los inhibidores de polimerasas bloquean estos procesos esenciales conduciendo a la muerte celular. En células de mamíferos hay dos tipos de topoisomerasas: Topo I, que rompen una hebra del ADN y Topo II, que rompe las dos hebras e induce cambios en la topología del ADN.

Hay muchos inhibidores de topoisomerasa. Dentro de los inhibidores de topoisomerasa de tipo II están: etopósido, NK-109, TOP-53, S16020-2. Como inhibidores de la topoisomerasa I están: camptotecina, CPT-11, topotecan, NB-506, J-107088, etc.

1.4.2.4 ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos antitumorales se descubrieron en 1930 con actinomicina A aislado de *Streptomyces* por Waksman and Woodruff. Posteriormente una variedad de antibióticos antitumorales como doxorubicina, daunorubicina, actinomicina D, mitomicina C y bleomicina fueron aislados de varias especies de *Streptomyces*.

Doxorubicina es un antibiótico antraciclínico citotóxico obtenido a partir de *Streptomyces peucetius caesius*. No se conoce el mecanismo exacto de la actividad antitumoral de la doxorubicina. Se cree que la inhibición del ADN, del ARN y de la síntesis proteica es la responsable de la mayor parte del efecto citotóxico. Esto probablemente sea el resultado de la intercalación de la antraciclina entre pares de bases adyacentes de la doble hélice del ADN impidiendo por consiguiente su desenrollamiento para la replicación.

La doxorubicina se utiliza en clínica para: sarcomas de tejidos blandos y osteogénicos, enfermedad de Hodgkin y linfomas no hodgkinianos, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloblástica aguda, carcinoma del tiroides, mama, ovario, vejiga urinaria, carcinoma broncogénico microcítico y neuroblastoma.

1.4.2.5 AGENTES ANTIMICROTÚBULOS

Son conocidos como antimitóticos. Los agentes antimicrotúbulos se pueden dividir en dos grupos dependiendo si polimerizan o despolimerizan los microtúbulos. Dentro de los que polimerizan se encuentra paclitaxel, docetaxel, etc. En el grupo de los que despolimerizan se encuentra vinblastina, vincristina, etc (Jordan and Wilson, 1998).

Paclitaxel es un agente antimicrotubular que estimula el ensamblaje de microtúbulos a partir de los dímeros de tubulina y estabiliza los microtúbulos impidiendo la despolimerización. Esta estabilidad provoca la inhibición de la reorganización dinámica normal de la red microtubular, que es esencial para la interfase vital y las funciones celulares mitóticas. Además, paclitaxel induce la formación de grupos anormales o haces de microtúbulos durante el ciclo celular. En la actualidad se utiliza en cáncer de ovario, mama, sarcoma de Kaposi cáncer de pulmón microcítico.

Vinblastina está indicada en el tratamiento paliativo de los siguientes tumores: enfermedad de Hodgkin, linfoma linfocítico, linfoma histiocítico, micosis fungoides, carcinoma testicular avanzado y sarcoma de Kaposi.

1.4.2.6 FÁRMACOS DIRIGIDOS A DIANAS MOLECULARES

Uno de los elementos claves de la investigación biomédica actual gracias al conocimiento de los mecanismos moleculares del cáncer es el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos contra proteínas específicamente implicadas en cáncer.

La primera de estas terapias diana desarrollada fue el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin®), que bloquea el receptor Her2 que está sobreexpresado por amplificación genética en el 25% de pacientes con cáncer de mama. Los pacientes con ésta amplificación tienen peor pronóstico, pero se demostró en un ensayo clínico que las mujeres con cáncer de mama avanzado que recibían este nuevo fármaco respondían mejor que aquellas que sólo recibían quimioterapia convencional.

Con el trastuzumab quedó demostrado que los tratamientos que actúan sobre una diana molecular podían ser utilizados en cáncer. Pero el éxito del imatinib mesilato (Glivec®), un inhibidor de tirosina quinasas en leucemias mielóides crónicas y tumores del estroma gastrointestinal (GIST), ha iniciado una nueva era en la terapia del cáncer, y cambiado nuestra mentalidad acerca del potencial de este tipo de tratamientos en cáncer. Imatinib fue diseñado para bloquear el sitio activo con actividad tirosina quinasa de la proteína quimérica BCR-ABL. El primer ensayo con imatinib demostró que el 98% de los pacientes con leucemia mieloide crónica resistentes a otras terapias respondían a este tratamiento. Imatinib es utilizado desde 2003 en nuestro país en primera línea en leucemias mieloides crónicas (Jordan and Wilson, 1998).

Durante los 15-20 últimos años se ha puesto un gran esfuerzo en la búsqueda de compuestos moduladores de rutas o moléculas específicas de células tumorales (dianas moleculares). Algunas de las dianas moleculares en diferentes fases de estudio o explotación se muestran en la **(Tabla 4)**. Hay en estudios clínicos multitud de nuevas moléculas que modulan estas rutas, algunas de las cuales ya se usan en tratamiento clínico (Awada et al., 2004).

Tabla 4: Compuestos moduladores de dianas moleculares.

DIANA MOLECULAR	PAPEL FISIOLÓGICO	MEDICAMENTO
EGFR	Receptor TK, proliferación	Herceptin, Erbitux, Iressa, Tarceva
VEGF	Receptor TK, proliferación	Avastin, Nexavar, Sutent
Proteosoma	Homeostasis	Velcade (Bortezomib)
Histona deacetilasas (HDACs)	Expresión génica	Vorinostat (SAHA)
Farnesyl transferasa (Ruta de Ras)	Proliferación celular	n.a
mTOR (ruta PI3K)	Proliferación celular	Temsirolimus
Familia Bcl-2 (anti-apoptosis)	Supervivencia celular	n.a
Heat shock protein (hsp)-90	Homeostasis celular	n.a

n.a ningún medicamento aprobado.

2 OBJETIVOS

1. Generar una plataforma celular de líneas mínimamente pasadas procedentes de muestras de tumores humanos.
2. Caracterizar citogenética, molecular y farmacológicamente dichas líneas celulares.
3. Estudiar la relevancia de marcadores moleculares en la respuesta a distintos fármacos antitumorales.
4. Caracterizar la respuesta de un panel de líneas de Sarcoma a fármacos marinos (Yondelis®, Aplidina® y Zalypsis®). Identificar marcadores moleculares de resistencia y sensibilidad a dichos fármacos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MUESTRAS PARA EL PROCESAMIENTO EN CULTIVOS.

Las muestras empleadas para este trabajo fueron proporcionadas por el Banco de Tumores del CNIO, procedentes de intervenciones realizadas a pacientes diagnosticados de cáncer. El origen fue verificado con los informes de anatomía patológica. Todas las muestras obtenidas tenían su correspondiente consentimiento informado.

Después de la intervención en el centro hospitalario colaborador, el tejido sobrante de la biopsia se puso en tubos falcon de 15 ml con medio de cultivo RPMI con 10% de suero bovino fetal, y se remitió al CNIO en la mayor brevedad posible.

3.2 MATERIAL DE CULTIVO CELULAR: SOPORTES, SUSTRATOS, MEDIOS, SUEROS Y ADITIVOS.

En el cultivo celular en monocapa llevado a cabo en este trabajo, las células son disgregadas del tejido de origen para ser sembradas en soportes sólidos de plástico estéril, desechable y previamente tratado por el fabricante para favorecer la adhesión celular. Las células se sembraron al inicio del cultivo en placas de 6 pocillos (Nunc). A medida que el cultivo progresó las células se crecieron en placas de 10 cm (Falcon).

Se utilizaron dos tipos de sustratos, de los cuales poli-L-lisina es sintético, y fibronectina es natural. La poli-L-lisina (Sigma) se empleó como sustrato a una concentración de 0.1 mg/ml. Esta disolución se preparó a partir de una disolución comercial de mayor concentración (1 mg/mL) que fue diluida con agua estéril. Se añadió 1 ml de la disolución de poli-L-lisina a cada pocillo. Las placas con el sustrato fueron expuestas a radiación ultravioleta durante 12h para favorecer la polimerización de la poli-L-lisina. Transcurrido ese tiempo, la disolución no polimerizada fue retirada de la placa. La película de poli-L-lisina adherida al fondo de la placa fue lavada 3 veces con agua estéril para eliminar los restos del sustrato que no hubieran polimerizado, ya que puede resultar tóxico para las células. Para la fibronectina se puso 1 ml de suero bovino fetal (Sigma) durante 2 h antes de la siembra en los pocillos, ya que el suero contiene fibronectina que es una globulina insoluble que promueve la adhesión celular (Hynes et al., 1992; Yamada and Geiger, 1997).

Los lavados de las muestras, así como los procesos de disección y disociación mecánica del tejido, fueron realizados en una disolución salina PBS (Sigma) suplementada con 40 µg/ml de penicilina, 40 µg/ml de estreptomycin y 1 µg/ml de fungizona (amphotericina B) (Gibco/ Invitrogen).

Todas las líneas celulares establecidas por el laboratorio se crecieron en medio F-10 con 1% de ultrosor G (Biosepra). Se utilizó RPMI-1640 (Sigma) para A673 y 1455, Leibovitz (Sigma) para SW872, y DMEM (Sigma) para SAOS-2. Estos medios se suplementaron con 40 µg/ml de penicilina, 40 µg/ml de estreptomycin y 1 µg/ml de fungizona

(amphotericina B) (Gibco/Invitrogen) y 10% de suero bovino fetal inactivado. El suero se inactivó 30 minutos a 50° en un baño de agua.

La esterilización de las disoluciones y de algunos suplementos para el medio de cultivo se realizó mediante filtración. La microfiltración se llevó a cabo con unidades de filtración (Millipore) de 0.2 µm de diámetro de poro.

3.3 TÉCNICA DE CULTIVO CELULAR.

Los fragmentos tisulares se pusieron con ayuda de unas pinzas en una placa petri de 10 cm, con solución PBS suplementada. El medio de cultivo en el que llegaron las muestras se centrifugó 5 minutos a 1000 rpm. El sedimento se lavó dos veces en 5 ml de PBS suplementado y se centrifugó. El sedimento obtenido después de los lavados se resuspendió en 3 ml de medio de cultivo y se sembró en un pocillo.

Se eliminaron los restos de necrosis y vasos sanguíneos del tejido con la ayuda del material de disección (bisturí, pinzas y tijeras). Posteriormente, se lavó 3 veces el tejido añadiendo 5 ml de PBS suplementado a la placa petri de 10 cm, dejando durante 5 minutos el tejido sumergido y después desechando este PBS y añadiendo nuevo.

Se puso 500 µl de collagenasa a una concentración final 0.65 mg/ml (Sigma) disuelta en HBSS (Biowhittaker). En la collagenasa se procedió a disgregar el tejido en fragmentos de 1 mm³ aproximadamente. La fragmentación del tejido se realizó con el material de disección. Los fragmentos obtenidos mediante disociación mecánica se introdujeron en tubos falcon de 15 ml con 1 ml de collagenasa y se dejó actuar la enzima durante dos horas a 37° C en el incubador de CO₂.

Pasado este tiempo, se pipeteó con una pipeta pasteur desechable varias veces los fragmentos medio disgregados. La suspensión celular obtenida por la actividad de la collagenasa y la disgregación mecánica se puso en un tubo falcon de 15 ml y se añadió 5 ml de medio de cultivo. Se centrifugó 5 minutos a 1000 rpm y el sedimento se resuspendió en medio de cultivo y se sembró en 2 o 3 pocillos, dependiendo de la cantidad de sedimento obtenido.

El resto de los fragmentos fueron sometidos a más disgregaciones enzimáticas, añadiendo 1 ml de collagenasa y repitiendo el proceso anteriormente descrito.

Estos ciclos de disgregación enzimática, pueden durar entre 4 y 24 horas en función de la dureza del tejido: cuanto más duro y fibroso más tiempo es sometido a la acción de las enzimas.

En los cultivos celulares de tumores epiteliales después de dos ciclos de collagenasa, los fragmentos fueron sometidos a una disgregación enzimática añadiendo 1 ml de tripsina/EDTA (Sigma) durante 15-30 minutos a 37°C en el incubador de CO₂. Posteriormente, se procesó el sobrenadante como en los casos anteriores.

3.3.1 MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS CULTIVOS.

Las células del cultivo se subcultivaron 1:2 cada tres días mediante tratamiento con tripsina/EDTA. Esto fue considerado un pase por homología con protocolos estandar de generación de líneas celulares.

El desarrollo del cultivo se analizó dos veces por semana, con la ayuda de un microscopio invertido (Leica). Se analizaron varios parámetros: ausencia de contaminación, adherencia celular, alteraciones celulares y proliferación.

Las células se mantuvieron en un incubador humidificado a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ (Nuair). Todas las manipulaciones se hicieron en una cabina de flujo laminar de Clase Bio II A (nivel 2 de seguridad biológica; Telstar).

Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 ml (Nunc), en su medio de cultivo normal con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Para descongelar un vial, se sumerge en un baño de agua a 37°C hasta su descongelación; a continuación se centrifuga el contenido en 5 ml de medio con suero y se resuspenden las células en su medio de cultivo habitual.

3.4 ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO.

Se realizó a todas las líneas celulares establecidas un análisis citogenético convencional. Las células en cultivo fueron expuestas a colcemida (Sigma) durante 4-6 horas a una concentración final de 0.01 ng/ml. Las células se levantaron de la placa y fueron sometidas a un tratamiento hipotónico (KCl, 0.07M), se fijaron en una solución de metanol-acético (3:1), se tiñeron con tripsina- Giemsa y finalmente se elaboró el cariotipo.

El protocolo de análisis citogenético fue realizado por el grupo de citogenética del CNIO.

3.5 INMUNOFENOTIPAJE.

La suspensión celular previamente tripsinizada de 10⁶ células en crecimiento exponencial se lavó dos veces con PBS, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 100 µl de PBS y se añadió 1 µl del anticuerpo anti-BrEP4 (Dako) que tiene conjugado FITC. Se incubó 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

El resto de anticuerpos no tenían el fluorocromo conjugado y se realizó un marcaje indirecto. El sedimento resuspendido en 100 µl de PBS fue incubado con 1 µl de los anticuerpos primarios: Vimentina (Dako), EMA (Dako), CD54 (Novocastra), S-100 (Dako), GFAP (Dako), E-cadheina (Dako), CK20 (Dako), CK8 (Dako), CKpool (Dako), V-Cam (Dako), N-Cadherina (Zymed), durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. A

continuación, se realizó un lavado con 10 ml de PBS centrifugando a 1000 rpm durante 5 minutos. Se resuspendió el sedimento en 100 μ l de PBS, y se añadió el anticuerpo secundario con FITC (Dako). Se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Todas las muestras, tanto las de marcaje directo como las de marcaje indirecto, se lavaron con 10 ml de PBS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 500 μ l de PBS para su adquisición.

Las células se analizaron con un citómetro analizador FACScalibur (BD Biosciences), utilizando el programa informático CellQuestPro (BD Biosciences) para la adquisición de datos. Se adquirieron 20000 eventos por cada condición experimental que se detectaron en el canal FL1.

3.6 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE PROTEÍNAS.

3.6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS.

Se crecieron las células en placas de 10 cm. Antes de que la placa llegara a confluencia se obtuvieron los lisados. Las células se lavaron con 5 ml de PBS dos veces, y se añadió 1 ml de tampón de lisis, que se dejó actuar durante 5 minutos. Se recogieron los lisados con ayuda de una punta estéril de 1 ml, en hielo, y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Los restos de desecho celular se eliminaron por centrifugación a 15000 x g durante 30 minutos a 4º y el sobrenadante (extracto proteico) se guardó en alícuotas a – 20ºC. La cuantificación de los extractos se realizó usando el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control la albúmina sérica (BSA).

Tampón de lisis: Tris-HCL 50 mM pH7.5, NP-40 1%, NaCl 150 mM. Además añadimos un inhibidor general de fosfatasa: $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 20 mM; un inhibidor de serina treonina fosfatasa NaF 100 mM, un inhibidor de tirosina fosfatasa, Na_3VO_4 2 mM, e inhibidores de proteasas (Roche Molecular Biochemicals).

3.6.2 WESTERN BLOT.

La inmunodetección de proteínas sobre membranas de PDVF (immobilon-P, Millipore) se realizó de acuerdo a un protocolo estándar. En primer lugar, los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, utilizando el sistema Mini-Protean 3 (BioRad).

Después de determinar la cantidad apropiada de proteína, la muestra se disolvió en tampón de carga (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.0025% (Sigma)). Y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS 7.5-15% en tampón de electroforesis (5X: Tris HCl 0.13 M, glicina 0.95 M, SDS 0.5 %). Posteriormente se transfirieron a membranas de PDVF, utilizando un equipo Mini-Trans-Blot Cell (BioRad). La transferencia se realizó a 200 mA durante 2 h en tampón de transferencia (TrisHCl 0.13 M, glicina 0.2 M, 20% metanol). Las membranas se bloquearon durante 4 h en agitación. El tampón de bloqueo contenía TBS, 0.1 % tween20 y 1% BSA. Se incubaron con la dilución adecuada de anticuerpo primario disuelto en tampón de bloqueo toda la noche en agitación a 4° C. Posteriormente, se lavó 3 veces durante cinco minutos con TBS con 0.1% de tween20, y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido en tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. La detección se realizó mediante una reacción quimiolumiscente (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) y la visualización con películas Kodak-X-Omat LS (Kodak).

Los anticuerpos primarios usados para este trabajo fueron: anti-p53 FL393 (Santa Cruz), anti-MDM2 (Santa Cruz), anti-CDK4 (Santa Cruz), anti-Ciclina D1 (Dako), anti-p27 (Transduction laboratorios), PTEN (Cascade bioscience), anti-pp60^{src} (Upstate Biotechnology), anti-PDGF (Santa Cruz), anti p21 (Santa Cruz), antiBax (Santa Cruz), anti-ERK2 (Santa Cruz), anti- ERK-p (Tyr 204) (Santa Cruz), anti-FKHR-p (Tyr 32) (Upstate Biotechnology), anti-AKT (Cell Signaling), anti-AKT (Ser 473) (Cell Signaling), anti AKT (Ser 1108) (Cell Signaling), anti Elp4G-p (Cell Signaling). Los anticuerpos secundarios usados fueron dependiendo del primario anti-mouse (Promega) o, anti-rabbit (Calbiochem).

3.6.3 INMUNOPRECIPITACIÓN.

Se obtuvieron lisados proteicos como se detalla en el apartado anterior. Se utilizó el volumen necesario de extracto conteniendo 150 µg de proteína. Se añadió 5 µl del anticuerpo c-kit (Santa Cruz) a los lisados celulares donde se forman complejos antígeno-anticuerpo. Estos complejos son precipitados por reacción con una fase sólida inmuoabsorbente que en nuestro caso fue proteína A (proteína de la superficie de *Staphylococcus aureus* con gran afinidad por el fragmento Fc de las Ig) unida a sepharosa (resina particulada insoluble). Se mantuvo en agitación suave durante 3 horas. Posteriormente, se añadieron 25 µl de proteína A sepharosa y se mantuvo en agitación durante 1 hora. Se lavó 4 veces con tampón de lavado (20mM Hepes pH 7.5, 150 mM

NaCl, 0.1 % Triton X-100, 10% glicerina, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$). Y por último, se pone el tampón de carga y realizó electroforesis en SDS-PAGE como se describe en el apartado anterior utilizando como anticuerpo primario anti-p-tirosina (Santa Cruz).

3.7 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN A NIVEL DE ARN

3.7.1 OBTENCIÓN DE ARN TOTAL.

El ARN total de las líneas celulares se purificó con la solución TRI-REAGEN (Molecular Research Center, Cincinnati Ohio), según las indicaciones del fabricante. Se crecieron las células en placas de 10 cm. Antes de que la placa llegara a confluencia, se lavaron las células dos veces con PBS, se les añadió 1 ml de reactivo y utilizando un punta de 1 ml estéril, se extrajo el lisado celular y se puso en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se homogenizó la muestra y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para la separación de las fases, se añadieron 200 μl de cloroformo y se agitó vigorosamente. Tras la incubación de la muestra durante 2-15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 15 minutos a 12000 x g, en frío. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo eppendorf y se precipitó el ARN con 500 μl de isopropanol. Posteriormente se incubó 5-10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g, 8 minutos en frío. Por último, se lavó con etanol al 70% y, tras centrifugación, se dejó secar al aire y se disolvió en 50 μl de agua tratada con DEPC.

3.7.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

La síntesis de cADN a partir de ARN total se realizó después del tratamiento con ADNsa, para lo cual se incubó el ARN obtenido con 100 μl de tampón de la enzima (2X) (20mM Tris HCl pH 8, 20 mM MgCl_2), 1 μl de inhibidor de RNasas (40 U/ μl ; Roche) y 4 μl de ADNsa (10U/ μl ; Roche) a 37°C durante 20 minutos. Tras inactivar la ADNsa a 4°C, se purificó el ARN libre de ADN mediante fenolización y se precipita con etanol.

La transcripción reversa se realizó mezclando, en hielo, 5 μg de ARN total y 0.5 μl de cebadores de secuencia aleatoria (random primers; Promega). Esta mezcla se desnaturalizó a 70°C, 10 minutos y se dejó de nuevo en hielo. Posteriormente se añadió 5 μl del tampón de la transcriptasa inversa (5X), 2 μl de dNTP (5 mM), 2 μl de la enzima MMLV (Promega) y hasta 12 μl de agua DEPC libre de RNasas. Se incubó la mezcla 1.5 h a 37°C. Tras parar la reacción a 70°C, 10 minutos, el ADNc está preparado. Se conserva a -20°C.

3.7.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se realizó mediante un procedimiento estándar. Se preparó una mezcla que contenía 0.2 mM de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada uno de los iniciadores, 2 mM de $MgCl_2$, 1U de Taq Pol y la cantidad adecuada de ADN molde, todo ello diluido en el tampón de reacción suministrado por el proveedor de la enzima. Las reacciones se realizaron en termocicladores Biometra T3. Las condiciones de reacción fueron específica para cada caso, pero se siguió un programa estándar: 3 minutos a 95°C, 30 ciclos de amplificación (1 minutos a 95°C, 1 minuto a 65°C o 55°C en función de su T_m , 1 minuto a 72°C) y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (**Tabla 5**).

3.7.4 DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DE P53.

La secuencia completa de p53 humano fue amplificado de las líneas celulares usando como cebadores específicos. 5'- ATGGAGGAGCCGAGTCAGATCC-3' y 5'- TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTG-3'. Se amplificó por PCR con una combinación de Taq y Pfu polimerasas. El fragmento de 1.281 pb fue clonado en el vector pGEM-T (Promega), y cinco clones positivos fueron secuenciados con cebadores directos e inversos de M13.

Tabla 5: Oligos utilizados.

Genes	Oligos	Tamaño del fragmento
PTEN	Oligo +: CAGAAAGACTTGAAGGCGTAT Oligo -: GTAACGGCTGAGGGAAGCTC	Tm 60 Tm 60 620 pb
P85	Oligo +: AA GAA CAG TGC CAG ACC CAA Oligo -: ACT CGT TCA ACT TCT TTT GCC	Tm60 Tm 60 310 pb
Apaf-1	Oligo +: AGG ACA TCA AGA CAT CCT AC Oligo -: CAC ACA GGA CTG TCC TTA CA	Tm 58 Tm 58 310 pb
p16	Oligo +: CAACGCACCGAATAGTTACG Oligo -: TACCGTGCGACATCGCGAT	Tm 60 Tm 60 270 pb
p15	Oligo + : ATGCGCGAGGAGAACAAGGGC Oligo - : GGGCGGCTGGGGAACCTGG	Tm 68 Tm 68 440 pb
p21	Oligo +: CATGTCAGAACCGGCTGGGGA Oligo -: CTTCTCTGCTGTCCCTGCA	Tm 68 Tm 68 320 pb
p27	Oligo + : ATGTCAAACGTGCGAGTGTC Oligo -: TTACGTTTGACGTCTTCTGAG	Tm 60 Tm 60 541 pb
p14ARF	Oligo +: GAGTGGCGCTGCTCACCTC Oligo - TACCGTGCGACATCGCGAT	Tm 60 Tm 60 510 pb
E-chaderin	Oligo +: TCCCATCAGCTGCCCAGAA Oligo -: ATGACTCCTGTGTTCTGTTA	Tm 60 Tm 60 500 pb
p73	Oligo +: TTTAACAGGATTGGGGTGTCCT Oligo -: CGTGAACTCCTCCTTGATGG	Tm62 Tm 62 410 pb
APC	Oligo + : GAATAGCCAGAATTCAGCAAATCG Oligo -: GAAAGTTTCATTAGAACACACACAG	Tm 68 Tm 68 720 pb
β -catenina	Oligo +: AGCTGATTTGATGGAGTTGGA Oligo - : GCTACTTGTTCTTGAGTGAAG	Tm60 Tm 60 240 pb
MSH2	Oligo +: AGAGATTGAATTTAGTGGAAGC Ooligo -: ACAATAGCTTATCAATATTACCTT	Tm 60 Tm 60 1777 pb
MLH1	Oligo +: GCATCTAGACGTTTCCTTGG Oligo -: GAGGAATTGGAGCCCAGGA	Tm 60 Tm 60 A: 367 pb
β actin	Oligo +: AGGCCAACCGCGAGAAGATGAC Oligo- : GAAGTCCAGGGCGACGTAGCA	Tm 70 Tm 68 330 pb

3.8 ENSAYOS PARA ANALIZAR LOS EFECTOS CELULARES DE LOS ANTITUMORALES.

3.8.1 CITOTOXICIDAD: MTT Y CRISTAL VIOLETA.

Todos los fármacos fueron ensayados en placas de 96 pocillos. Las células se sembraron a una densidad de 1000 a 4000 células por pocillo. La concentración dependió del tamaño y del crecimiento. Las células fueron crecidas durante 24 h antes de añadir la compuesto. Los compuestos fueron diluidos a una concentración final de 200X. El volumen apropiado de compuesto (normalmente 2 μ l) fue añadido automáticamente (Beckman FX96) al medio de cultivo. Cada concentración de fármaco se realizó por triplicado. En cada placa de 96 pocillos teníamos dos tipos de controles, uno que contiene medio sin compuesto y otro que corresponde al medio con el volumen que se dispensó de DMSO. Las células fueron expuestas a la compuesto durante 96h.

Finalmente se estimó el número de células mediante el ensayo de MTT, también llamado test de inhibición de la Succinato Deshidrogenasa (SDI). Se trata de un ensayo colorimétrico que mide la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa.

Pasadas 96h de exposición al compuesto se añaden 50 μ l por pocillo de una disolución recién preparada en medio de cultivo de MTT a una concentración final de 1 mg/ml. Se incuban las placas con el MTT durante 5 horas a 37^o C. Posteriormente, se elimina el medio y se añade 50 μ l de DMSO en cada pocillo, y se cuantifica las células supervivientes midiendo la absorbancia a 544 nM, usando un equipo Victor 3.

Por último se calcula el IC₅₀ que es la concentración de compuesto necesaria para reducir la absorbancia a la mitad del control con DMSO. Estos datos se calculan ajustando los datos a una curva sigmoidea mediante el programa Prism 3.0.

3.8.2 ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

La distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo con IP, un agente intercalante que produce fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN que contiene cada célula.

La suspensión previamente tripsinizada de 10⁶ células en crecimiento exponencial se lavó dos veces con PBS, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de etanol al 70% frío (-20°C), añadido lentamente en agitación suave. Esta suspensión se conservó a -20°C durante al menos 30 minutos. A continuación se realizó un lavado con 10 ml de PBS centrifugando a 1000 rpm durante 5 minutos y se resuspendieron las células en 500 μ l de PBS. Se

añadieron 5 µl de RNasa A (20 mg/ml; Roche) y 10 µl de IP (1 mg/ml; Sigma) justo en el momento de analizar la muestra. Las células se analizaron con un citómetro FACScalibur (BD Biosciences), utilizando los programas informáticos CellQuestPro (BD Biosciences) para la adquisición de datos y ModFit LT 3.0 (Verita Software House, Inc) para la cuantificación de las fases del ciclo. Se adquirieron 20000 eventos por cada condición experimental y la fluorescencia con IP se detectó en el canal FL2.

3.8.3 DOBLE TINCIÓN CON YODURO DE PROPIDIO Y ANEXINA.

10⁶ células en crecimiento exponencial, se recogieron (tanto el sobrenadante como las células pegadas) y se centrifugaron a 1000 rpm, durante 5 minutos. Se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón 1X (BD Pharmigen; 10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) para ser incubadas con 5 µl de anexina V (BD Pharmigen) y 10 µl de IP durante 15 minutos en la oscuridad. El análisis se realizó con un citómetro FACScalibur (BD Biosciences), utilizando el programa informático CellQuestPro (BD Biosciences) para la adquisición de datos.

3.8.4 NÚCLEOS APOPTÓTICOS.

La apoptosis fue visualizada por marcaje de las células con Hoechst 33258 pentahidrato (Molecular-Probes) durante 5 minutos. Las células se examinaron con un microscopio de fluorescencia Leica y las células apoptóticas se identificaron por la condensación de fragmentos en la región nuclear. Analizamos 400 células por tratamiento y los resultados se presentan en porcentaje.

3.8.5 ENSAYO CLONOGÉNICO.

Los fármacos fueron ensayados en placas de 6 pocillos. Las células fueron sembradas a una densidad de 1000 células por pocillo. Las células se sembraron y se dejaron crecer durante 24 h antes de añadir el fármaco. Posteriormente se añadió 5 ml de medio de cultivo a las células con las diferentes dosis de fármaco. Estos ensayos se hicieron por triplicado. El medio se cambió cada 3 días por medio fresco con el compuesto. Cuando se observaron colonias en el control se fijaron las placas con 0.5% de glutaraldehído y se tiñeron con cristal violeta. Por último, se contaron las colonias.

3.9 TRANSFECCIONES.

3.9.1 MÉTODO DEL FOSFATO CÁLCICO.

La mezcla del CaCl_2 , ADN y tampón fosfato origina la precipitación de pequeñas partículas insolubles de fosfato cálcico que contienen el ADN condensado (Graham and van der Eb, 1973a, b). Estos complejos se adhieren a la membrana plasmática y entran en las células por fagocitosis.

Las células se sembraron el día anterior a la transfección, de manera que estén a una confluencia del 70-80% en el momento de la transfección. Previo a la transfección, se cambió el medio a DMEM con 10% de SBF. Se añadieron 20 μg de ADN plasmídico a 50 μl de CaCl_2 2.5 M hasta un volumen final de 500 μl . Se añadió 500 μl de 2xHBS (50 mM Hepes, pH7.00, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4), que deben de ser añadidos mientras se producen burbujas en la solución. Se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió la suspensión al medio de cultivo gota a gota y moviendo lentamente la placa para distribuirlo homogéneamente. Las células se incubaron 12-16 horas con los precipitados. Se añadió medio nuevo y se incubaron las placas en condiciones óptimas para la línea celular usada.

3.9.2 ARN DE INTERFERENCIA PARA P27^{KIP1}

Tres shARN fueron seleccionados en programas de predicción que corresponden con: GCA CTG CAG AGA GGA A (122 bases antes del codon de iniciación), CCG ACG ATT CTT CTA CTC A (451 bases antes del codon de iniciación) y GAG CCA ACA GAA CAG AAG A (477 bases antes del codon de iniciación).

Como vector se utilizó pA70Retro derivado de pSuperRetro.

Las células de las líneas A673, AA y AW fueron plaqueadas en placas de 10cm al 50% de confluencia y se transfectaron 24h después con el método de cloruro calcio. Los clones fueron seleccionados en puomicina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma).

3.9.3 INFECCIÓN RETROVIRAL.

Se sembraron células de empaquetamiento Phoenix. Las partículas retrovirales se produjeron por transfección transitoria de las células anteriores con el vector retroviral de interés, mediante el protocolo del fosfato cálcico (descrito en el apartado anterior). Tras 12 horas de incubación a 37°C, se les cambió el medio a las células y se dejaron 48 horas a 32°C. Después de 48 h, el medio que contiene los virus fue filtrado con unidades de 0.45 μM (Millipore) y se suplementó con 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de polybrene (Sigma) y con el mismo volumen de medio fresco. Las células primarias se crecieron en placas de 6 pocillos. Para

la infección el medio de cultivo se reemplazó por el medio con virus, las placas de 6 pocillos se centrifugaron 1 hora a 1500 rpm y se incubaron a 32 °C durante 8h. Después se cambió el medio y se crecieron.

3.10 ENSAYOS EN RATONES DESNUDOS

Para determinar la tumorigenicidad, inyectamos subcutáneamente 4×10^6 células en los flancos traseros de ratones desnudos hembras, de cuatro semanas, embebidos en Matrigel (BD Biosciences). Los animales fueron examinados semanalmente y mantenidos durante 7 semanas. Los tumores fueron medidos usando un calibre. El volumen del tumor (mm^3) se determina usando la fórmula $(a^2 \cdot b)/2$, donde A es el ancho y B la longitud. Todos los experimentos fueron realizados con el protocolo experimental aprobado por el Comité para el Cuidado y Uso de los Animales del CNIO.

4 RESULTADOS

4.1 GENERACIÓN DE HERRAMIENTAS PARA ESTUDIAR LA RESPUESTA A TRATAMIENTOS QUIMIOTERÁPICOS.

Uno de los principales problemas que surgen a la hora de estudiar la respuesta a fármacos *in vitro* es la escasez de líneas celulares que mantengan características del tejido tumoral original. Con objeto de disponer de sistemas celulares adecuados que permitan caracterizar desde un punto de vista farmacogenómico compuestos antitumorales y con una cierta proyección predictiva de su comportamiento *in vivo*, se generó un panel de líneas celulares con bajo número de pases procedentes de tejido tumoral de diferentes orígenes (**Figura 2**). Todas las líneas celulares se mantuvieron en bajo número de pases, menor de 20, para minimizar las alteraciones genéticas secundarias que pudieran aparecer como consecuencia de su mantenimiento prolongado en cultivo. Las líneas celulares generadas en el presente trabajo presentaron adaptabilidad a un medio de cultivo estándar. Además, se comprobó su asepsia incluyendo contaminación por micoplasmas, y se verificó su origen mediante estudios de anatomía patológica.

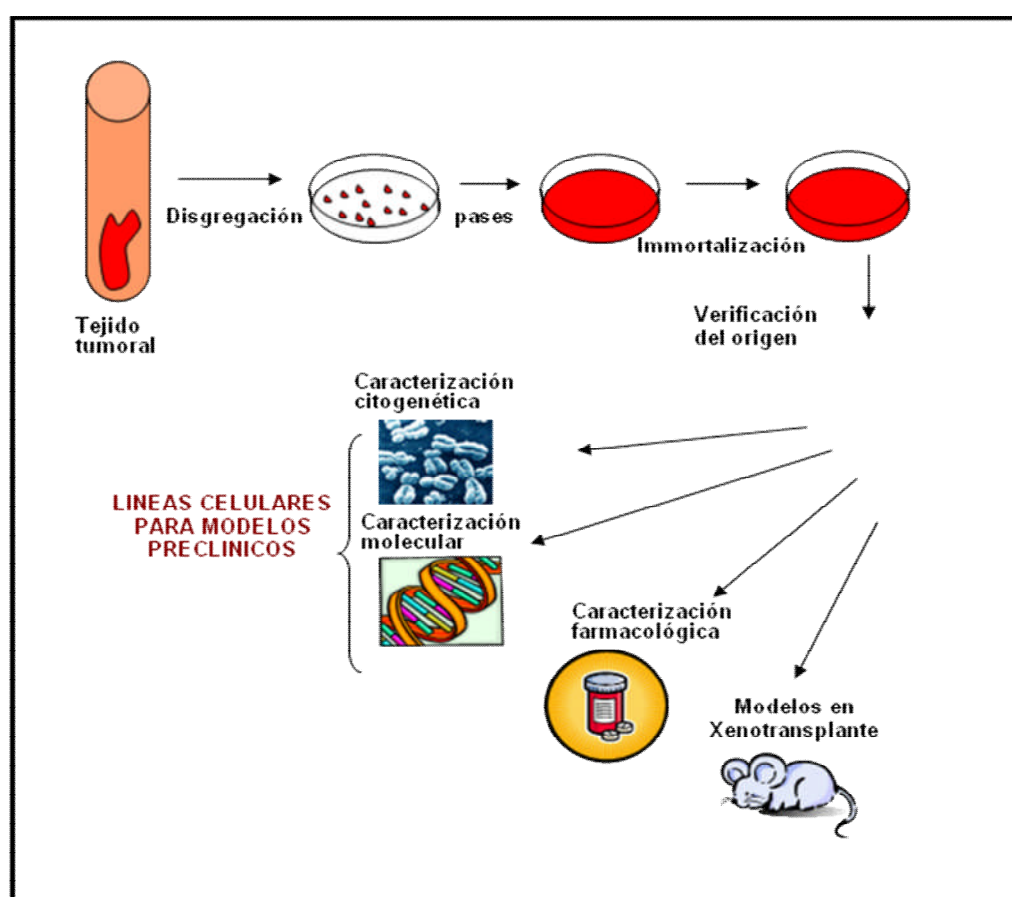


Figura 2. Esquema representando la generación de líneas celulares y su caracterización. De un fragmento de tejido se aislaron células, como se indica en el texto, y se inmortalizaron a través de subcultivo seriado. Estas células se caracterizaron a nivel citogenético, molecular y farmacológico. Por último se analizó su crecimiento en ratones desnudos.

Entre todos los tejidos presentes en el panel de líneas celulares, nos centramos en el estudio en profundidad de las líneas procedentes de sarcomas para dar uniformidad al trabajo. Este tipo de tumores no está representado en el panel de líneas celulares del NCI y consideramos que era interesante por la respuesta tan pobre que tiene en la actualidad a las diferentes terapias. Además, los sarcomas representan el 20% de los tumores pediátricos.

Las líneas de sarcoma generadas se caracterizaron citogenéticamente mediante análisis del cariotipo. Molecularmente mediante el análisis de la expresión de ARNm y proteínas de genes comúnmente alterados en cáncer. Farmacológicamente, estudiamos los perfiles de sensibilidad y/o resistencia de las líneas celulares a fármacos conocidos (**Figura 2**). Por último, se caracterizó su capacidad tumorigénica, es decir, de producir tumores en ratones desnudos. Con todos los datos obtenidos se generó una matriz de información que mediante herramientas bioinformáticas adecuadas nos permitió relacionar alteraciones moleculares con patrones de resistencia o sensibilidad a compuestos antitumorales.

4.1.1 ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.

Los cultivos celulares se iniciaron disociando células del tejido tumoral de origen mediante procesos enzimáticos y mecánicos según el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos. Inicialmente los cultivos primarios eran heterogéneos y presentaban distintos tipos celulares (**Figura 3**). Para evitar que las células sufrieran por la confluencia en cultivo periódicamente se procedió a sembrarlas diluyéndolas a la mitad. Este proceso fue considerado un pase por homología con los protocolos estándar de generación de líneas celulares. Las células se mantuvieron en cultivo continuo para su inmortalización. Durante el proceso se observaron varias paradas de crecimiento del cultivo (senescencia y/o crisis) (**Figura 4**). Superadas éstas, se seleccionó un cultivo celular homogéneo procedente de cada muestra tumoral procesada.

4.1.1.1 CULTIVO PRIMARIO

En los tejidos, la adhesión entre células está mediada por una amplia variedad de interacciones glicopeptídicas que son sensibles a proteasas. Para disgregar las células realizamos una digestión enzimática con collagenasa para intentar preservar al máximo su viabilidad, ya que otras enzimas como la tripsina pueden dañar la membrana celular. En los cultivos procedentes de células epiteliales, tras varias rondas de disgregación con collagenasa, los fragmentos de tejido restantes se sometieron a digestión final con tripsina. La collagenasa es muy efectiva en la disgregación de tejido conectivo mientras que la tripsina reduce la contaminación con fibroblastos del cultivo de células epiteliales.

Combinando ambos protocolos obtuvimos poblaciones enriquecidas en células epiteliales.

Los cultivos primarios dieron lugar a una población celular muy abundante que permitió establecer líneas celulares. Los cultivos no mostraron diferencias de comportamiento en los diferentes sustratos (colágeno, poli-L-lisina, suero y plástico), observándose un comportamiento similar en adhesión, tipos celulares y proliferación. Por ello la descripción del proceso de cultivo se generalizó para todas las muestras usando plástico como sustrato de cultivo. Como excepción, los cultivos primarios de tiroides se crecieron sobre poli-L-lisina ya que la población era más homogénea y su crecimiento más robusto.

4.1.1.2 CULTIVOS CELULARES CONTINUOS

La población de células cancerígenas tiene capacidad replicativa ilimitada en cultivo lo que las diferencia de las células somáticas que tienen una capacidad replicativa limitada (Hanahan and Weinberg, 2000).

En el proceso de establecimiento de las líneas celulares se siguieron las características morfológicas del cultivo tres veces por semana en el microscopio de contraste de fases. Durante los primeros cinco o diez días (pase 0) se observó que el cultivo estaba formado por células con diferentes morfologías. Se observaron células con morfología fibroblástica que crecían formando redes, así como células con morfología epitelial que crecían formando grupos (**Figura 3**). En general, los cultivos primarios son muy heterogéneos, existiendo grandes diferencias morfológicas tanto entre cultivos procedentes de una misma muestra como entre tipos celulares procedentes de muestras de distintos tejidos.

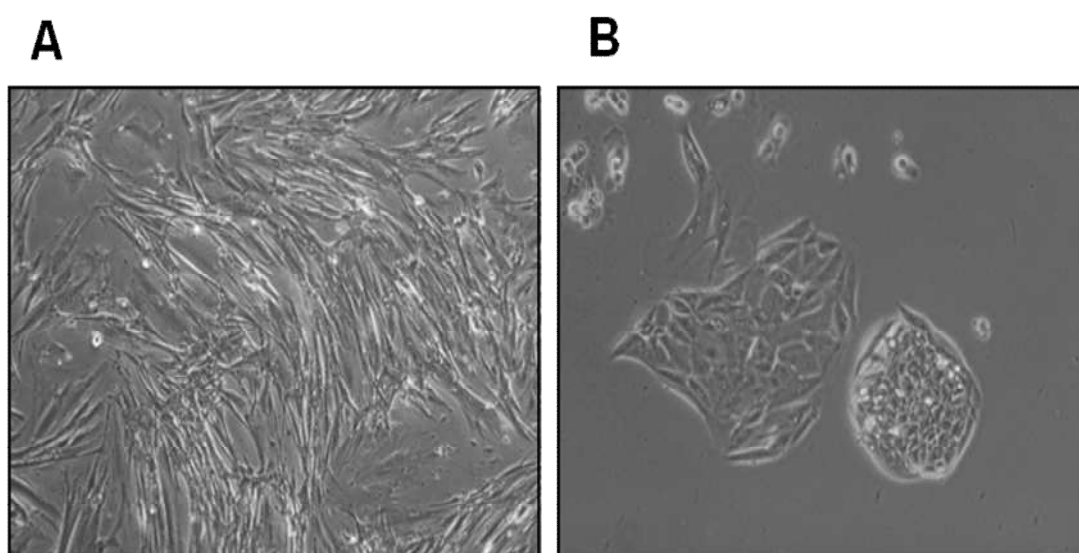


Figura 3. Diferentes morfologías en cultivos primarios. (A) Células con morfología fibroblástica formando redes. **(B)** Células con morfología epitelial formando grupos.

A medida que progresaron los cultivos (tercer o cuarto pase), se observó que, en general, éstos disminuían su potencial de crecimiento de forma paralela a la aparición en todos ellos de unas células con fenotipo senescente, muy grandes, aplanadas y polinucleadas (**Figura 4**). En función del porcentaje de células de este tipo la parada del cultivo era de mayor o menor intensidad, pero en ningún caso se observó muerte celular. En general, esta primera parada no impidió que el cultivo siguiera adelante, tan sólo supuso un cierto retraso en el crecimiento y una selección. Las células con morfología senescente, al no dividirse, se fueron perdiendo con los sucesivos pases. Por sus características fenotípicas (parada celular, morfología, polinucleación) identificamos esta crisis inicial como senescencia ocurriendo en la mayor parte de células no tumorales presentes en la muestra de tejido (Campisi, 1997; Faragher et al., 1998; Rubin, 1998).

Posteriormente observamos un segundo bloqueo en el crecimiento de los cultivos, caracterizado por la presencia de muerte celular. Esta segunda crisis la asociamos con la etapa de muerte celular como consecuencia del acortamiento de telómeros y alteraciones cromosómicas (Vaziri and Benchimol, 1999; Vaziri et al., 1999). Este periodo no fue igual para todos los cultivos. En algunos casos la muerte celular fue masiva, hasta el punto de no superar este bloqueo. No obstante, en otros casos, a pesar del periodo de crisis con abundante muerte celular, algunas células sobrevivieron, formaron clones y finalmente terminaron llenando la placa. También hay que decir que en algunos cultivos no se produjo parada por muerte celular.

Una vez superada la fase de selección en cultivo, en general a partir del pase número diez, consideramos que las líneas estaban establecidas. De cualquier modo, mantuvimos una muestra de cada una de las líneas generadas hasta pase treinta o cuarenta para confirmar la inmortalización del cultivo.

Mención aparte merecen las líneas celulares CNIO AW y AX, ya que ambas se establecieron a partir de un mismo tejido tumoral. A los veinte días de cultivo en el pase número tres se observaron dos morfologías diferentes en distintos pocillos que se mantuvieron por separado y de las que finalmente se establecieron dos líneas celulares diferentes. La línea CNIO AW presentaba una morfología tipo fibroblasto y CNIO AX una morfología tipo epitelial. Mientras la línea CNIO AW sufrió los dos bloqueos en su crecimiento descritos previamente, su pareja CNIO AX no sufrió el segundo bloqueo (crisis). Las dos líneas fueron posteriormente caracterizadas citogenéticamente mostrando distintos cariotipos (**Tabla 11**), confirmando así su origen independiente.

Siguiendo esta metodología se establecieron un total de cincuenta y nueve líneas celulares de diferente origen. Veintisiete líneas procedentes de tumores de origen endodérmico (carcinomas) (**Tabla 6**), veinticinco procedentes de neoplasias de origen mesodérmico (sarcomas), tres líneas procedentes de tumores cerebrales, tres líneas de melanoma, y una línea procedente de una micosis fungoide.

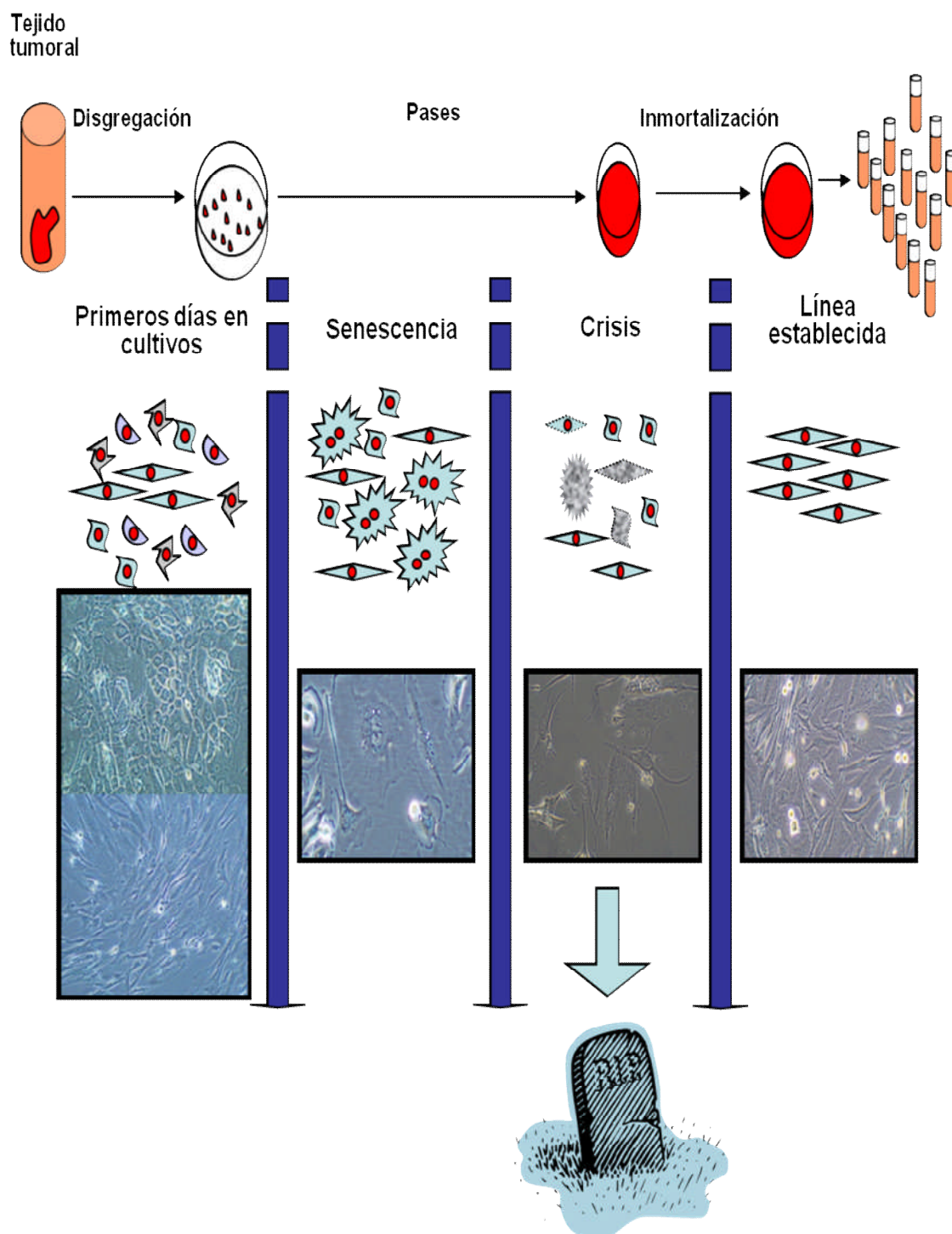


Figura 4. Esquema del establecimiento de las líneas celulares. Los primeros días se obtiene un cultivo muy heterogéneo con diferentes morfologías. En pase 3-4 se observan células aplanadas y multinucleadas que se relacionan con senescencia. Posteriormente se observó muerte celular que en algunos casos finalizó con el cultivo. Las células que superaron esos dos bloqueos en el crecimiento se consideraron inmortales, hecho que se confirmó manteniéndolas en cultivo por treinta pases adicionales.

Tabla 6: Líneas celulares establecidas durante el desarrollo de este trabajo.

LINEA CELULAR	ORIGEN DEL TUMOR	LINEA CELULAR	ORIGEN DEL TUMOR
CNIO AB	Carcinoma de Vejiga	CNIO BH	Angiosarcoma
CNIO AF	Carcinoma de Vejiga	CNIO BD	Sarcoma de Ewing
CNIO AN	Carcinoma de mama	CNIO BN	Fibrohistocitoma
CNIO AO	Carcinoma de mama	CNIO AZ	Tumor fibroso
CNIO AP	Carcinoma de mama	CNIO BI	GIST
CNIO AQ	Carcinoma de mama	CNIO BY	Hemangioma
CNIO AR	Carcinoma de mama	CNIO BM	Hibernoma
CNIO AV	Carcinoma de mama	CNIO AA	Leiomiomasarcoma
CNIO AD	Adenocarcinoma de colon	CNIO AY	Leiomiomasarcoma
CNIO AG	Adenocarcinoma de colon	CNIO CQ	Leiomiomasarcoma
CNIO CF	Adenocarcinoma de colon	CNIO AW	Liposarcoma
CNIO AT	Carcinoma de endometrio	CNIO AX	Liposarcoma
CNIO AU	Adenocarcinoma de endometrio	CNIO BK	Liposarcoma
CNIO CB	Adenocarcinoma de endometrio	CNIO BO	Liposarcoma
CNIO AL	Carcinoma epidermoide	CNIO AI	Mesotelioma
CNIO AC	Carcinoma epidermoide	CNIO BG	Fibrosarcoma mixoide
CNIO BX	Adenocarcinoma gástrico	CNIO BC	MPNST
CNIO AJ	NSCLC	CNIO BB	MPNST
CNIO BT	NSCLC	CNIO BE	Osteosarcoma
CNIO BU	NSCLC	CNIO BF	Osteosarcoma
CNIO BV	NSCLC	CNIO BP	Osteosarcoma
CNIO BW	NSCLC	CNIO BJ	Osteosarcoma
CNIO CC	NSCLC	CNIO CE	Rabdomiosarcoma
CNIO CD	NSCLC	CNIO BL	Sarcoma sinovial
CNIO AE	Adenoma paratiroideo	CNIO BA	Tumor de Wilm's
CNIO AM	Carcinoma tiroideo	CNIO AH	Melanoma
CNIO AS	Carcinoma uterino	CNIO AK	Melanoma
CNIO BR	Astrocitoma	CNIO BQ	Melanoma
CNIO BZ	Meningioma	CNIO CG	Micosis fungoide
CNIO CA	Meningioma		

(Amarillo) Líneas procedentes de diferentes tipos de carcinomas. **(Gris)** Líneas establecidas de diferentes tipos de sarcomas **(Azul)** Líneas de tumores cerebrales. **(Verde)** Líneas de melanoma. **(Naranja)** Línea procedente de una micosis fungoide. **NSCLC:** Tumor de pulmón no microcítico, **GIST:** Sarcoma gastrointestinal, **MPNST:** Tumor maligno del nervio periférico.

4.1.2 INMORTALIZACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES DE MAMA Y OVARIO PROCEDENTES DE MUJERES PORTADORAS DE MUTACIONES EN EL GEN BRCA.

Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 son muy comunes en familias con predisposición a sufrir cáncer de mama y ovario. Estas mutaciones son muy penetrantes e incrementan significativamente el riesgo de cáncer de mama (Iau et al., 2001).

Se immortalizaron líneas celulares procedentes de operaciones profilácticas de mama y ovario de mujeres portadoras de mutaciones en BRCA1 o BRCA2. Se obtuvieron tres muestras de tejido de mama (**Tabla 7**) que se procesaron siguiendo la metodología descrita en el apartado de materiales y métodos. Según los informes de anatomía patológica, las muestras correspondían con una ligera ectasia ductal, carcinoma ductal infiltrante y mama normal.

Tabla 7: Líneas celulares establecidas procedentes de mujeres portadoras de mutaciones en BRCA/BRCA2

LÍNEA CELULAR	ORIGEN DEL TUMOR	MUTACIÓN
CNIO CI	Ligera ectasia ductal	BRCA2
CNIO CJ	Ligera ectasia ductal	BRCA2
CNIO CL	Carcinoma ductal infiltrante	BRCA1
CNIO CM	Carcinoma ductal infiltrante	BRCA1
CNIO CG	Mama normal	BRCA1
CNIO CP	Ovario normal	BRCA2

Todas las muestras fueron infectadas en pase dos con un vector retroviral que expresaba la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT (**Figura 5**). De cada muestra se trataron por separado cultivo primario no infectado y el primario que expresaba el vector retroviral. Las células procedentes de tejido no tumoral crecieron normalmente hasta pase cinco (25-30 días). Pasado este tiempo entraban en muerte celular o crisis y el cultivo se perdía. Sin embargo, el cultivo primario transducido con hTERT se immortalizó eficientemente, manteniendo su crecimiento de forma ilimitada y dando lugar a la línea celular CNIO CG. Con esta metodología, sin usar oncogenes virales, obtuvimos una línea celular de tejido normal con mutación en BRCA1. Del tejido procedente de una paciente diagnosticada con ectasia ductal se establecieron dos líneas celulares, una por immortalización espontánea CNIO CI, y otra por expresión de hTERT, CNIO CJ. La segunda línea no sufrió parada en el crecimiento, sin embargo, la línea CNIO CI sufrió un periodo muy acentuado de muerte celular, y sólo un pequeño número de células sobrevivió. El proceso fue similar con la muestra procedente de carcinoma ductal infiltrante, dando

lugar a las líneas CNIO CL y CNIO CM, generadas por inmortalización espontánea y por expresión de hTERT respectivamente.

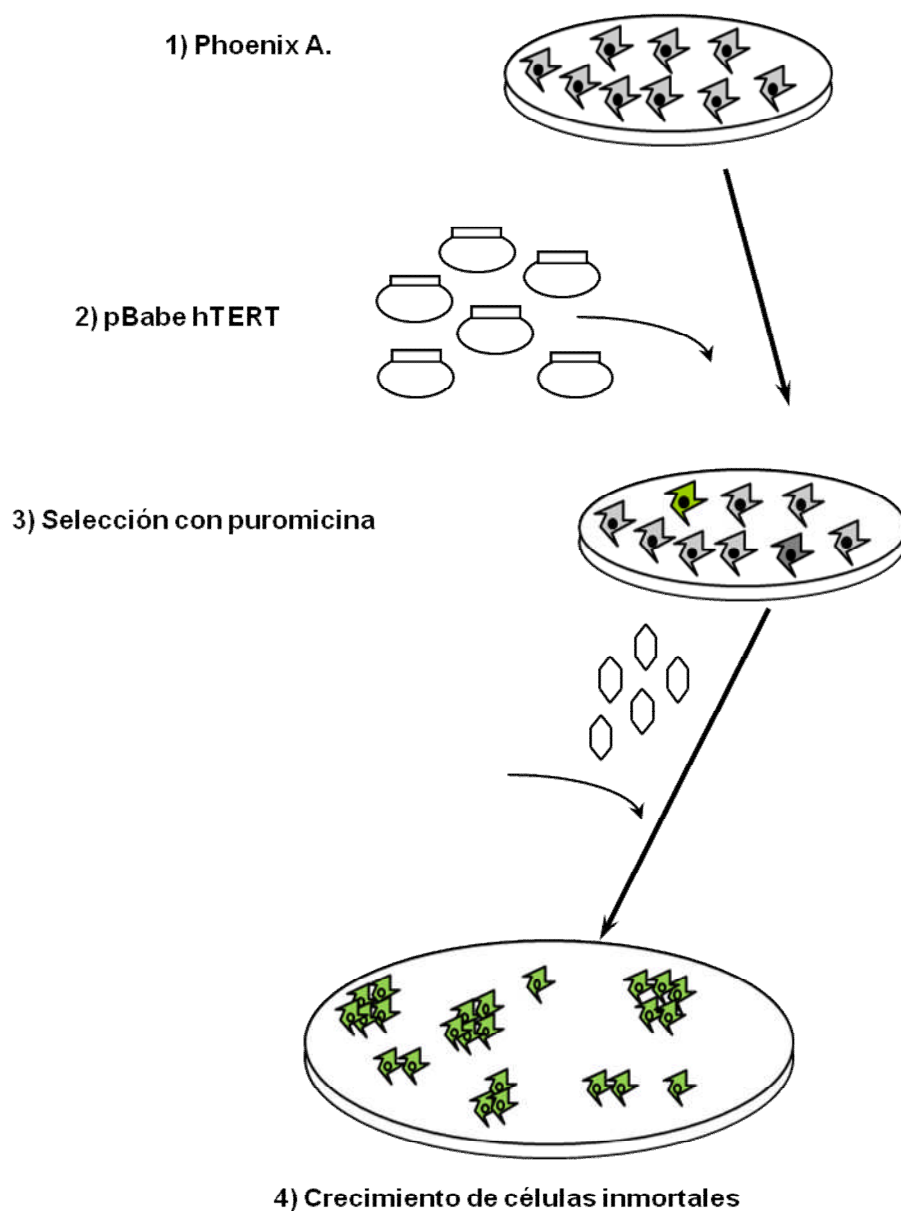


Figura 5. Proceso de infección de células primarias con un vector retroviral que expresa la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT.

En paralelo procesamos cinco muestras de ovario no tumoral siguiendo la misma metodología. En este caso no se logró inmortalizar ninguna línea mediante infección con el vector retroviral hTERT. Los cultivos primarios de cuatro muestras no pudieron transformarse en línea celular. Sólo una muestra de ovario se inmortalizó de forma espontánea y dando lugar a la línea CNIO CP.

4.1.3 SELECCIÓN DE POBLACIONES CELULARES

En los cultivos primarios se encuentran varios tipos celulares, incluyendo células neoplásicas, endoteliales, musculares, linfocitos, granulocitos, macrófagos, y células normales del tejido donde se encuentra el tumor. Los componentes hematopoyéticos crecen en suspensión y se pierden con los cambios de medio. Los macrófagos y granulocitos son células muy adherentes y no proliferan, de forma que se pierden en los diferentes pases. Las células musculares sólo crecen en medios selectivos con factores de crecimiento apropiados. Las células procedentes de tejido normal tienen una vida replicativa limitada. Además, estas células tienen una tasa de crecimiento menor que las tumorales cuando mantenemos el cultivo a alta densidad celular de forma que favorecemos el crecimiento de las células tumorales frente a las normales.

El mayor problema de contaminación celular de un cultivo primario son los fibroblastos que crecen rápidamente favorecidos por factores mitogénicos derivados de las células tumorales. Por ello buscamos la manera de eliminar los fibroblastos del cultivo primario. En primer lugar intentamos separar la población de células epiteliales aislando clones pero en cultivos primarios esta técnica tiene una eficiencia muy baja, ya que la clonabilidad a baja densidad es de aproximadamente 1/100. Para solventar este problema intentamos separar las poblaciones de células epiteliales mediante citometría de flujo ya que con esta técnica podemos evitar el efecto de la baja densidad. Seleccionamos un grupo de marcadores específicos que nos permitieran discriminar de forma fiable células de origen epitelial de aquellas de origen fibroblástico mediante un citómetro-sorter (**Figura 6**).

Para poner a punto esta metodología seleccionamos dos líneas celulares, T47D procedente de un carcinoma de mama humano, e IMR-90 que son fibroblastos primarios de pulmón humano. Caracterizamos ambas líneas para la expresión de cuatro marcadores. BerEP4, un antígeno epitelial humano que reacciona con dos glicoproteínas que están presentes en la membrana celular y el citoplasma de células epiteliales. CD54, la molécula de adhesión 1 (ICAM-1), reacciona con glicoproteínas integrales de membrana, pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y su ligando, LFA, está expresado en muchos tipos celulares. EMA, es un miembro de un grupo heterogéneo de glicoproteínas, está presente en la membrana de células epiteliales secretoras. Vimentina, es una de las proteínas que constituyen los filamentos intermedios, y está presente en células mesenquimales.

El análisis mostró que un 80% de las células de la línea T47D eran positivas para BerEP4 y un 40% para EMA. Las células T47D eran negativas para vimentina y CD54. Por el contrario, las células IMR-90 eran negativas para BerEP4 y EMA, y positivas en un 4% para vimentina y en un 3% para CD54 (**Figura 6**).

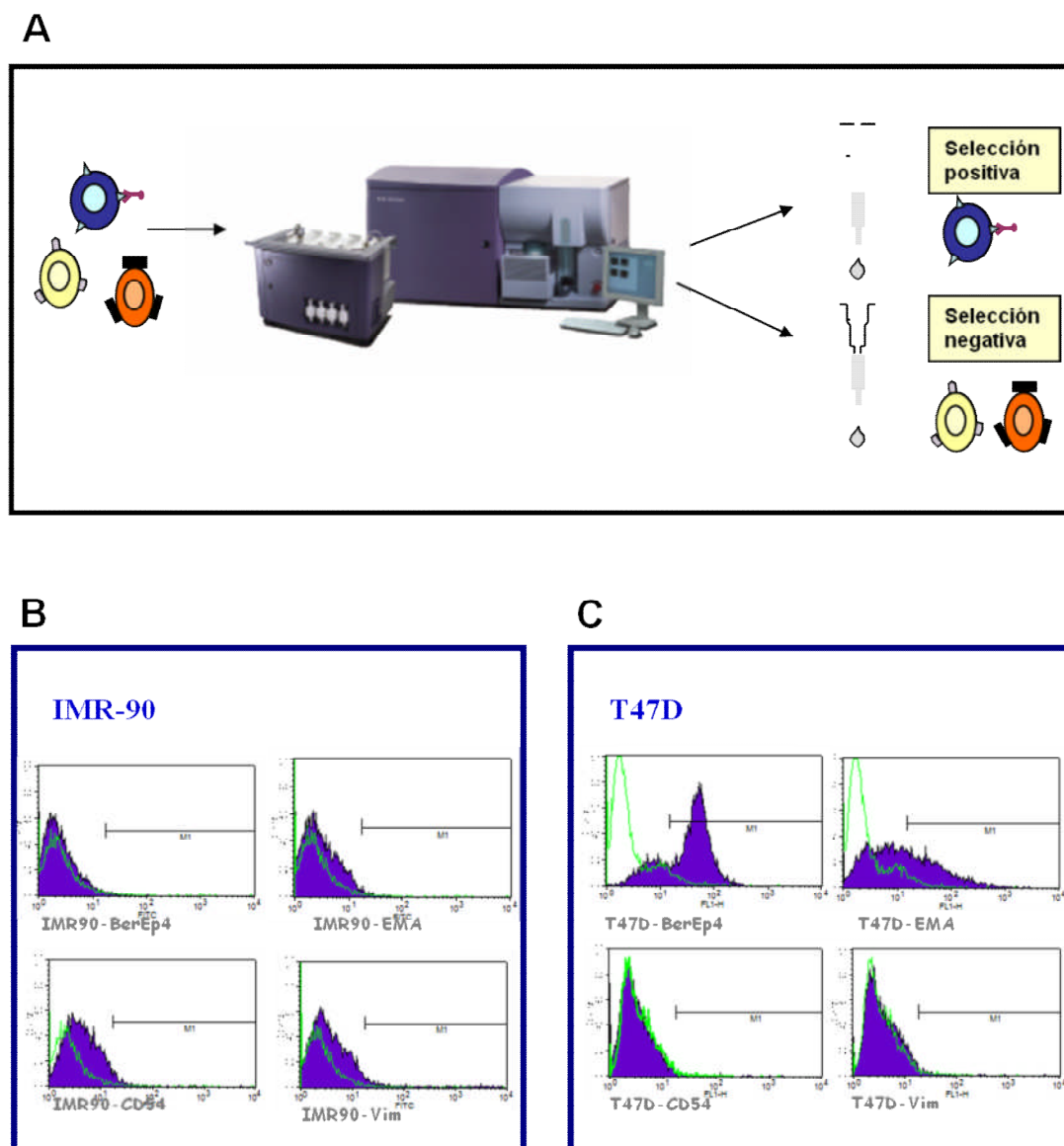


Figura 6. Análisis de marcadores BerEp4 y Vimentina por FACS en células T47D y IMR90. (A) Esquema de la metodología seguida para separar diferentes poblaciones celulares por sorter seleccionando las células por expresar el marcador (selección positiva) o no (selección negativa). **(B)** Expresión de los marcadores BerEp4, EMA, CD54 y Vimentina en células IMR-90 por FACS según la metodología descrita en el apartado de materiales y métodos. **(C)** Expresión de los marcadores BerEp4, EMA, CD54 y Vimentina en células T47D por FACS.

Realizamos este mismo análisis en un total de veintisiete líneas celulares de diferentes orígenes. Ocho de estas líneas proceden de tumores de origen mesodérmico (en gris), ocho corresponden a tumores de mama, ovario, hígado, colon y próstata (amarillo claro), cinco tumores de pulmón (verde), tres glioblastomas (naranja), dos melanomas (azul) y un queratinocito (amarillo oscuro).

Tabla 8. Análisis presencia o ausencia de diferentes marcadores en un panel de líneas celulares.

LINEA CELULAR	TIPO DE TUMOR	BerEP4	EMA	Vim	CD54
IMR-90	Fibroblastos normales	-	-	+	+
1455	Liposarcoma	-	-	-	-
A673	Sarcoma de Ewing	-	-	+	-
SW872	Liposarcoma	-	-	+	-
CNIO AA	Leiomiomasarcoma	-	-	+	-
CNIO BG	Fibrosarcoma mixoide	-	-	+	-
CNIO BI	GIST	-	-	+	-
CNIO BF	Ostrosarcoma	-	-	+	-
T47D	Carcinoma de mama	+	+	-	-
MCF7	Carcinoma de mama	+		-	-
SKOV3	Adenocarcinoma de ovario	+	-	+	-
CH1	Carcinoma de ovario	-	-	+	-
HEPG2	Hepatocarcinoma	+	+	-	+
COLO 205	Adenocarcinoma colorectal	+	-	-	-
HCT116	Carcinoma colorectal	+	-	-	-
PC3	Adenocarcinoma de próstata	+	-	-	-
H1299	NSCLC	-	-	+	-
A549	Carcinoma de pulmón	-	-	+	-
A427	Carcinoma de pulmón	+	-	-	-
H522	NSCLC	+	-	-	-
BU	NSCLC	-	-	+	-
U87 MG	Glioblastoma	-	-	-	-
SF767	Glioblastoma	+	-	-	-
SF268	Glioblastoma	-	-	-	-
A375	Melanoma	-	-	+	-
HS895T	Melanoma	-/+	-	+/-	-
HACAT	Keratinocitos	+	+/-	-/+	-/+

Líneas celulares de diferente origen en las que se estudió la expresión de los marcadores BerEP4, EMA, Vimentina y CD54. Clasificación: + presencia de marcador; - ausencia de marcador; +/- débil presencia de marcador.

Todas las líneas con origen mesodérmico fueron negativas para BerEP4 y EMA. Exceptuando IMR-90, todas fueron negativas también para CD54. Asimismo, salvo las células 1455 todas las líneas de sarcoma mostraron cierta positividad para vimentina. Aunque al ser Vimentina un antígeno intracelular el porcentaje de positivos observado estaba en torno al 5-10%. Sin embargo, las células consideradas negativas tenían valores de 0. No observamos diferencias en cuanto a la expresión de marcadores, entre sarcomas comerciales y los establecidos en este laboratorio.

Todas las líneas procedentes de carcinomas de mama, ovario, hígado, colon y próstata, excepto CH1, fueron positivas para BerEP4, y tan sólo dos de ellas T47D y Hep-G2, fueron positivas para EMA. La mayoría de las líneas son negativas para vimentina y CD54. Por lo tanto encontramos correlación entre células epiteliales de estos orígenes, y la expresión de BerEP4.

En el resto de líneas celulares estudiadas (pulmón, glioblastoma, melanoma y queratinocitos), no encontramos ninguna relación relevante con los marcadores. Por ello ampliamos el panel de marcadores y analizamos en todas las líneas la expresión de citoqueratinas 7, 8, 20 y un conjunto, GFAP, S-100, E-cadherina, N-cadherina y V-CAM, sin encontrar ninguna correlación que nos permitiera usarlas como marcadores de selección (datos no mostrados).

Para comprobar si la expresión de BerEP4 y vimentina eran suficientes para separar por citometría poblaciones de fibroblastos de células epiteliales, mezclamos dos líneas celulares, IMR-90 y T47D, a la misma proporción (**Figura 7A**). Hicimos la selección separando las células positivas para BerEP4 de las negativas, o las células positivas para vimentina de las negativas, o separando al tiempo las positivas para ambos marcadores. Nuestros resultados mostraron que el mejor marcador para separar los diferentes tipos celulares, fue BerEP4 como marcador único, ya que nos permitía obtener una población más pura y un mayor número de células (**Figura 7B**).

Para verificar los resultados analizamos la expresión de BerEP4, vimentina y de ambos marcadores al tiempo en las células separadas. Pudimos comprobar que las células T47D expresaban BerEP4 en su superficie pero no observamos marcaje con vimentina (**Figura 7C**). Las células IMR-90 sólo expresaban vimentina y no BerEP4 (**Figura 7C**). La baja expresión de vimentina observada en citometría podría ser debida a que vimentina es un componente de los filamentos intermedios con poca exposición externa.

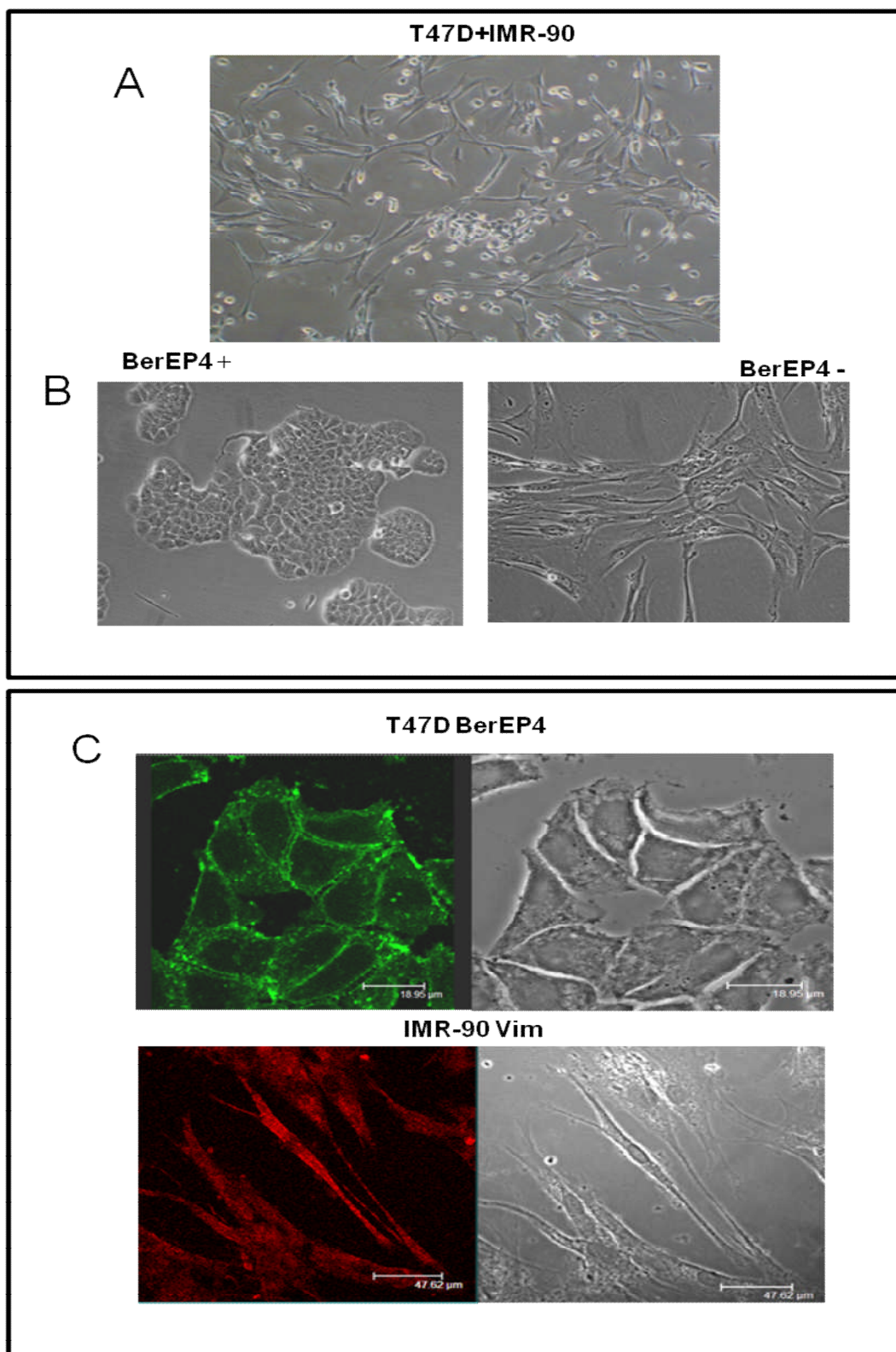


Figura 7. Separación de poblaciones celulares por BerEP4. (A) Cultivo celular con las dos poblaciones celulares T47D y IMR-90. **(B)** Separación por citometría de flujo de las dos poblaciones celulares positivas o negativas para BerEP4. **(C)** Confirmación de la expresión de BerEP4 y no vimentina en T47D, y expresión de vimentina y no BerEP4 en fibroblastos humanos.

4.1.4 CAPACIDAD TUMORIGÉNICA *IN VIVO*.

Para determinar la tumorigenicidad de las líneas celulares generadas, se inyectó una selección de las mismas en dos estirpes de ratones inmunodeficientes. Por un lado ratones desnudos, que son animales con mutación en el gen del factor de transcripción *wnt* que, en homocigosis, provoca carencia de timo y deficiencia en células T; y por otro lado animales NOD-SCID, que son homocigotos para la mutación SCID y tienen perdida la función de los linfocitos T y B, así como la de las células NK y la capacidad de estimular la actividad complementaria. Se inyectaron subcutáneamente 4×10^6 células (solas o embebidas en matrigel) de cada línea celular en los flancos traseros de los animales (Topley et al., 1993) (Tabla 9).

Tabla 9: Tumorigenicidad *in vivo* de diferentes líneas celulares

Línea Celular	Ratón desnudo Sin matrigel Tumor >100 mm ³ / Nº Inyecciones	Ratón desnudo Con matrigel Tumor >100 mm ³ / Nº Inyecciones	NOD-SCID Sin matrigel Tumor >100 mm ³ / Nº Inyecciones	NOD-SCID Con matrigel Tumor >100 mm ³ / Nº Inyecciones
CNIO AA	0/6	1/1	0/1	0/1
CNIO AH	0/6	1/1	1/1	0/1
CNIO AK	0/6		1/1	1/1
CNIO AL	0/6	1/1		
CNIO AM	0/6	1/1	0/1	1/1
CNIO BD	0/4		0/1	1/1
CNIO AW	0/6	1/1	0/1	0/1
CNIO AX	0/6	1/1	0/1	0/1
CNIO BA	0/1	1/1	0/1	0/1
CNIO AZ		1/1	0/1	1/1
CNIO BB		1/1		
CNIO BD 2ºR				4/4
CNIO BD 3ºR				4/4

Número de inyecciones subcutáneas de cada línea celular en las patas traseras de animales desnudos o NOD-SCID, y número de tumores que desarrollaron un volumen superior a 100 mm³. Las inoculaciones se hicieron con o sin matrigel, según se indica.

Observamos que la mayoría de líneas formaban tumores de un volumen entre 100-200 mm³ y que después paraban el crecimiento. El estudio de los tumores mostró que tenían alto porcentaje de áreas necrosadas. La inyección de células embebidas en matrigel facilitó el crecimiento de las células formando tumores pero no fue suficiente para producir crecimiento exponencial. Sólo una de las líneas, CNIO BD, mostró crecimiento exponencial. Esta línea tenía un cariotipo normal por lo que decidimos estudiar el efecto que el subcultivo en ratones atímicos podía producir en la línea.

Una vez inyectadas las células en el ratón, se dejaron crecer entre cuatro y seis semanas. Pasado este tiempo se extrajo el tumor y se cultivaron las células hasta tener una población suficientemente grande para volver a inocularlas en un animal. Las células fueron analizadas cariotípicamente tras la tercera ronda de subcultivo en ratón. Observamos que las células que se habían seleccionado durante los sucesivos pases creciendo en xenotransplante presentaban un cariotipo complejo con múltiples alteraciones genéticas (**Figura 8**). Quisimos analizar si estas alteraciones eran debidas a inestabilidad de las propias células o eran producidas cuando se inoculaban en el animal. Para ello mantuvimos las células durante seis meses en cultivo, analizamos el cariotipo, y la línea celular seguía manteniendo el cariotipo no alterado (**Figura 8**).

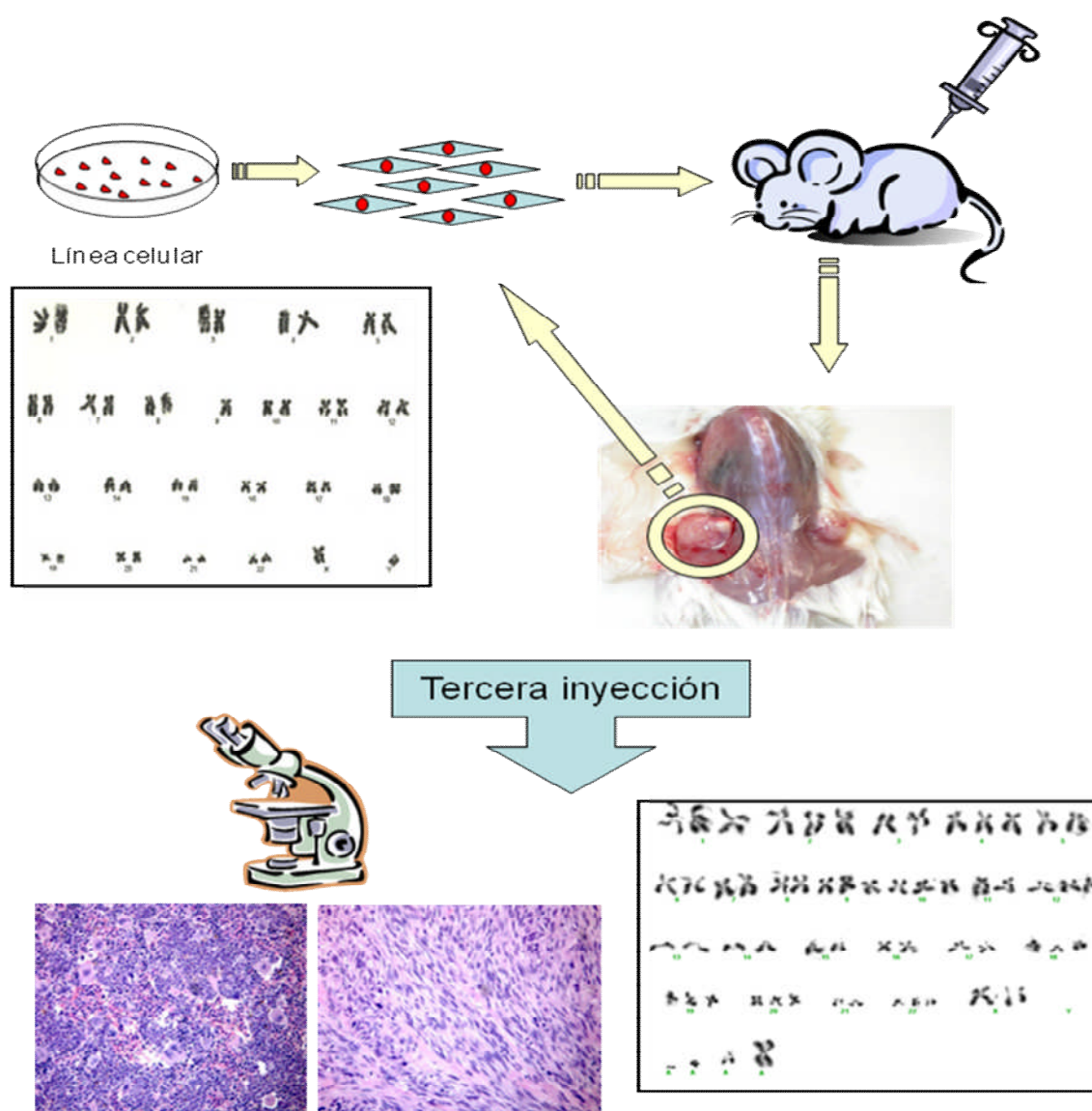


Figura 8. Procedimiento de inoculación de líneas celulares en ratones. Inmunohistoquímica y cariotipos de los tumores producidos por la línea celular CNIO BD.

4.2 PANEL DE LÍNEAS CELULARES DE SARCOMA

Con el objeto de enfocar mejor nuestro trabajo nos centramos en el panel de 20 líneas celulares procedentes de sarcomas. En primer lugar confirmamos su origen con los informes de anatomía patológica. Así, el panel incluye: tres liposarcomas, dos de ellos procedentes de la misma muestra de tejido, y según su informe procedente de una pieza quirúrgica de bíceps femoral con liposarcoma de alto grado de patrón mixto mixoide. Están presentes también dos leiomiomas, uno de ellos uterino, un tumor fibroso de pleura, dos sarcomas de nervio periférico (MPNST), cuatro osteosarcomas, un fibrosarcoma mixoide, un hibernoma, un fibrohistiocitoma, un rabdomiosarcoma y un tumor estromal gástrico (GIST). Además, en este estudio se incluyen cuatro líneas comerciales, de las cuales dos son liposarcomas (SW872 y 1455), un sarcoma de Ewing (A673) y un osteosarcoma (SAOS-2) (**Tabla 10**).

Tabla 10: Panel de líneas de Sarcomas.

LÍNEA CELULAR	ORIGEN DEL TUMOR	FENOTIPO	TIEMPO DE DUPLICACIÓN (horas)
CNIO AW	Liposarcoma	Fibroblástico	48 h
CNIO AX	Liposarcoma	Epitelial	48 h
SW872	Liposarcoma	Fibroblástico	24h
CNIO BK	Liposarcoma	Fibroblástico	96h
1455	Liposarcoma	Fibroblástico	48 h
CNIO AA	Leiomioma	Epitelial	36h
CNIO AY	Leiomioma	Fibroblástico	48h
CNIO AZ	Tumor fibroso	Fibroblástico	96h
CNIO BC	MPNST	Epitelial	96h
CNIO BB	MPNST	Fibroblástico	72h
A673	Sarcoma de Ewing	Fibroblástico	24h
CNIO BJ	Osteosarcoma	Epitelial	96h
CNIO BF	Osteosarcoma	Epitelial	24h
CNIO BP	Osteosarcoma	Epitelial	48h
SAOS-2	Osteosarcoma	Epitelial	48h
CNIO BG	Fibrosarcoma mixoide	Fibroblástico	24h
CNIO BM	Hibernoma	Fibroblástico	96h
CNIO BN	Fibrohistiocitoma	Fibroblástico	72h
CNIO CE	Rabdomiosarcoma	Fibroblástico	48h
CNIO BI	GIST	Epitelial	24h

MPNST: Tumor maligno del nervio periférico. **GIST:** tumor estromal gástrico

A continuación definimos su fenotipo, epitelial o fibroblástico, observando su morfología en cultivo. De las veinte líneas incluidas en el panel doce presentaban fenotipo fibroblástico y ocho epitelial.

Por último caracterizamos el tiempo de duplicación de las diferentes líneas. Para ello realizamos curvas de crecimiento y calculamos el tiempo de duplicación durante el crecimiento exponencial mostrado por cada línea. Diferenciamos cinco grupos en cuanto a su tasa de crecimiento. Al primer grupo pertenecían las líneas que se dividían cada 24 horas, que incluían SW872, A673, CNIO BF, CNIO BG y CNIO BI. Segundo grupo, constituido por la línea CNIO AA que se divide cada 36 horas. El tercero, con un tiempo de duplicación de 48 horas, está formado por las líneas CNIO AW, CNIO AX, 1455, CNIO AY, CNIO BP, SAOS-2 y CNIO CE. El cuarto grupo, cuyo tiempo de duplicación fue de 72 horas, estaba compuesto por las líneas CNIO BB y CNIO BN. Por último, las líneas CNIO BK, CNIO AZ, CNIO BC, CNIO BJ y CNIO BM que tardan más en dividirse con una duplicación cada 96 horas, pertenecen al grupo cinco.

4.2.1 CARACTERIZACIÓN CITOGÉNÉTICA.

Se realizó un análisis citogenético convencional, consistente en el estudio de las alteraciones cromosómicas según se observan durante la metafase de las células obtenidas tras cultivo *in vitro*. El estudio de la morfología de los cromosomas teñidos con bandas G (tripsina-Giemsa), permite detectar tanto las alteraciones numéricas (monosomías, trisomías, etc), como las estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones, etc) presentes en el genoma. Esta caracterización se realizó en la unidad de citogenética del CNIO.

En los cariotipos obtenidos se observaron cuatro líneas con cariotipo normal: CNIO AY, CNIO BC, CNIO BB y CNIO CE. Dos líneas presentaron cariotipo ligeramente alterado, en CNIO AW se observó una trisomía del cromosoma 3, y en CNIO AZ una trisomía del cromosoma 8. Dos líneas celulares CNIO AX y CNIO AA, presentaron triploidía en todas las células analizadas con un cariotipo complejo con varias alteraciones numéricas y estructurales. La línea CNIO BP presentó un cariotipo tetraploide con amplificaciones genéticas en forma de cromosomas dobles menudos. Las líneas CNIO BF, CNIO BG y CNIO BI presentaron, como las líneas comerciales SW872, 1455, A673 y SAOS-2 cariotipos complejos, con numerosos marcadores característicos de sarcomas (**Tabla 11**).

Tabla 11: Caracterización citogenética del panel de líneas de sarcoma.

LINEA CELULAR	ORIGEN DEL TUMOR	CARIOTIPO
CNIO AW	Liposarcoma	46,XY/47 +3/50%/50%
CNIO AX	Liposarcoma	62-65,<3n>,-3,-4,-5,+7,der(7)t(7;?),add(8)(p?),i(8)(q10),-9,-11,der(11)t(5;11),-13, add(14)(q32),-15,x2,-16,-18,+1-4mar cp5]
SW872	Liposarcoma	(5)t(5;?)(q31;?)1,dre(5)t(5;?)(q31;?)2,der(6)t(6;?)(q15:?),der(7)t(7;?)(q36;?),t(15q16q
CNIO BK	Liposarcoma	ND
1455	Liposarcoma	42-52,XY,der(3)t(3;?)8(q?;?),+5,-10,t(12;16)(q12:16)(q12;p11.2), +1-6mar [cp8]
CNIO AA	Leiomiomasarcoma	55-63<3n>XXY,-3,-4,-8,i(8)(q10),add(8)(p23),der(11)t(5;11)(q13;p15),-12,-13,-14,-16,der(1;7)t(17;?)(p?;?)-18,-22, mar 1-3
CNIO AY	Leiomiomasarcoma	46, XX
CNIO AZ	Tumor fibroso	46,XX/47,XX+8/50%/50%
CNIO BC	MPNST	46, XX
CNIO BB	MPNST	46, XX
A673	Sarcoma de Ewing	46~47,XX,der(1)t(1;9)p36;q22),der(3)del(3)(p21) del(3)(q21),del(4)(q21q31),(5;8)(q33;q21),der(9)t(9;13)(q22;q14),+der(11)t(11;13)(p13;q14),der(13)t(1;13)p36;q14),der(13)t(11;13)(q13;q14)(11;22)(q24;q12),der(16)t(3;16)(q21?;q22),der(22)t(11;22) (q24;q12) [cp15].
CNIO BJ	Osteosarcoma	ND
CNIO BF	Osteosarcoma	56,Y,+1,+2,X2,+7X2,add(7)(q32?)+i(8)(q10),+10,+11.der(11)t(';11)(?;p13),add (15)(p21),-17,+19,+20,-22x2,+3mar
CNIO BP	Osteosarcoma	4n. Amplificaciones génicas en forma de cromosomas dobles menudos.
SAOS-2	Osteosarcoma	56,XX. 6p+/q+, 7p+, 11p+, and 12p+ .
CNIO BG	Fibrosarcoma mixoide	44-49.XY,der(1)t(1;3)(q12;p12).-3,-4,+6,+7x2,der(11)t(10;11;15),-13x2,-15,+der(16)t(16;?)(q12;?),del(17)(p11.2)+20[cp4]
CNIO BM	Hibernoma	ND
CNIO BN	Fibrohistocitoma	ND
CNIO CE	Rabdomiosarcom	46XY
CNIO BI	GIST	57,XY,-4,-7, i(8)(q10),-9,-10,der(11)t(10;11;15),-12,-13,-4x3,-15,+17,-18,-19,+21,-22,+4mar[cp2]

ND: No analizado

Las dos líneas procedentes del mismo tumor CNIO AW y CNIO AX mostraron cariotipos muy diferentes. Mientras que CNIO AW presentó únicamente una trisomía en el cromosoma 3, CNIO AX mostró múltiples alteraciones cromosómicas (**Figura 9**).

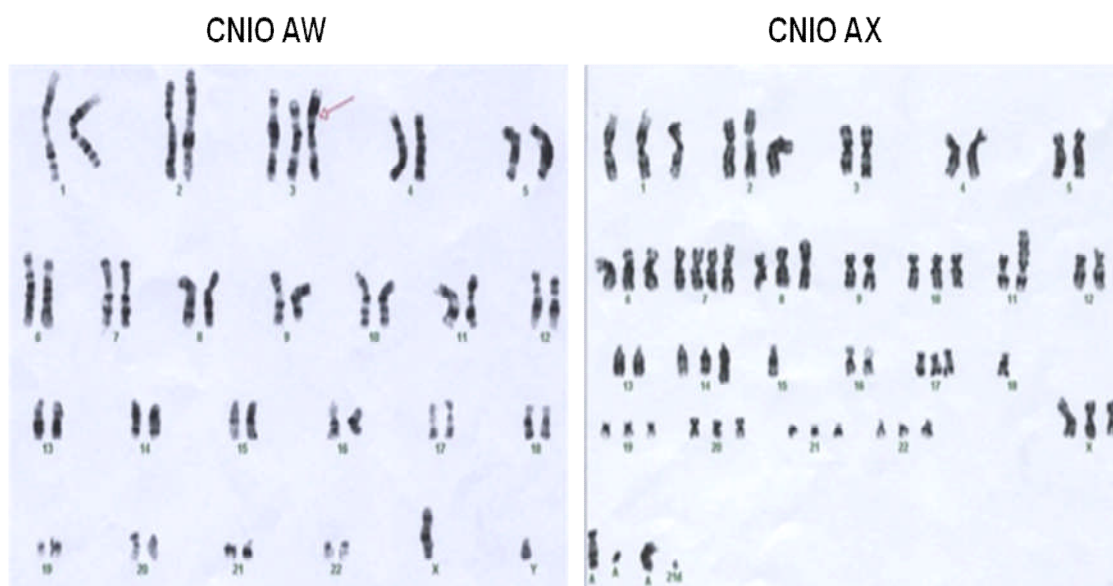


Figura 9. Cariotipo de las líneas celulares AW y AX. Estas líneas proceden de la misma muestra, pero la línea AW presenta cariotipo ligeramente alterado con trisomía en el cromosoma 3, mientras que la línea celular AX mostró cariotipo complejo con varias alteraciones citogenéticas.

En las líneas con cariotipo complejo, se realizó un cariotipo espectral (SKY), para su confirmación (**Figura 10**).

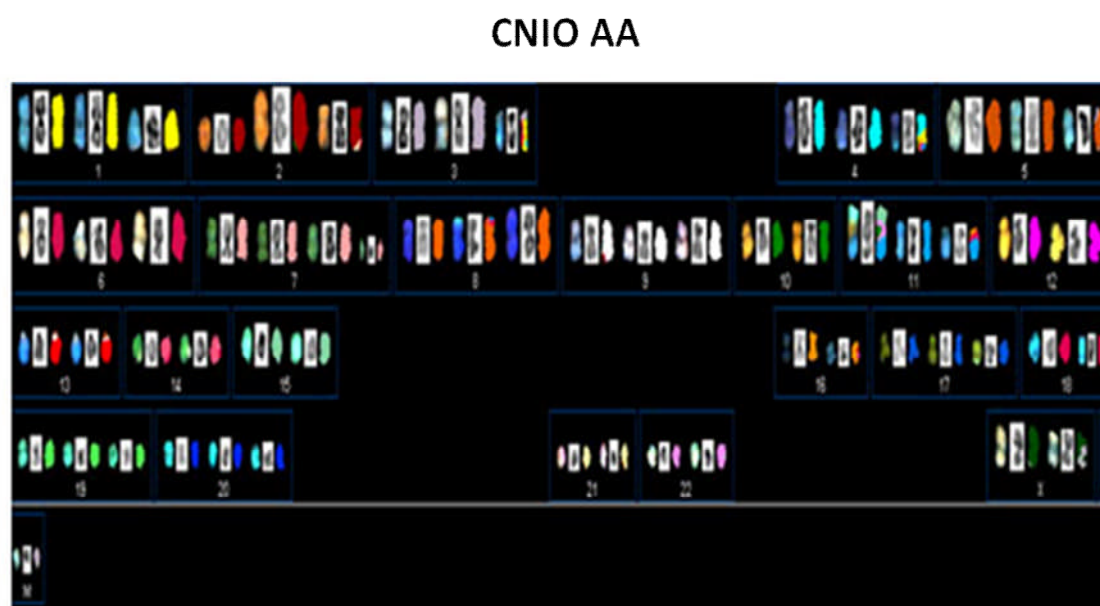


Figura 10. Ejemplo de SKY, línea celular AA.

4.2.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

4.2.2.1 EXPRESIÓN DE ONCOGENES Y SUPRESORES DE TUMORES A NIVEL DE ARN MENSAJERO

Se obtuvo ADNc según el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos, y se analizó la presencia de transcrito para 12 genes comunmente alterados, a nivel de transcripción, en tumores humanos. Estos fueron: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p14^{ARF}, p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, MSH-2, MLH-1, Apaf-1, p73, E-cadherina, β-catenina y APC.

El locus INK4a/b está formado por los genes p16^{INK4a}, p15^{INK4b} de la familia INK4 (inhibidores de CDKs), y por el gen p14^{ARF} (se une a MDM2 impidiendo que se una a p53 para su ubiquitinización). Se pudo observar que estos genes estaban presentes en trece de las veinte líneas. Seis de las siete líneas restantes no presentaron transcrito para ninguno de los tres genes del locus. Sin embargo, en CNIO BC no estaban presentes p16^{INK4a} ni p14^{ARF}, pero sí p15^{INK4b}.

Las proteínas CIP/KIP inhiben todos los complejos CDK-ciclina. La familia esta constituida por tres genes, p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}. Analizamos p21^{CIP1} y p27^{KIP1}. Se pudo observar que p21^{CIP1} está presente en todos los sarcomas, al igual p27^{KIP1} (**Figura 11**).

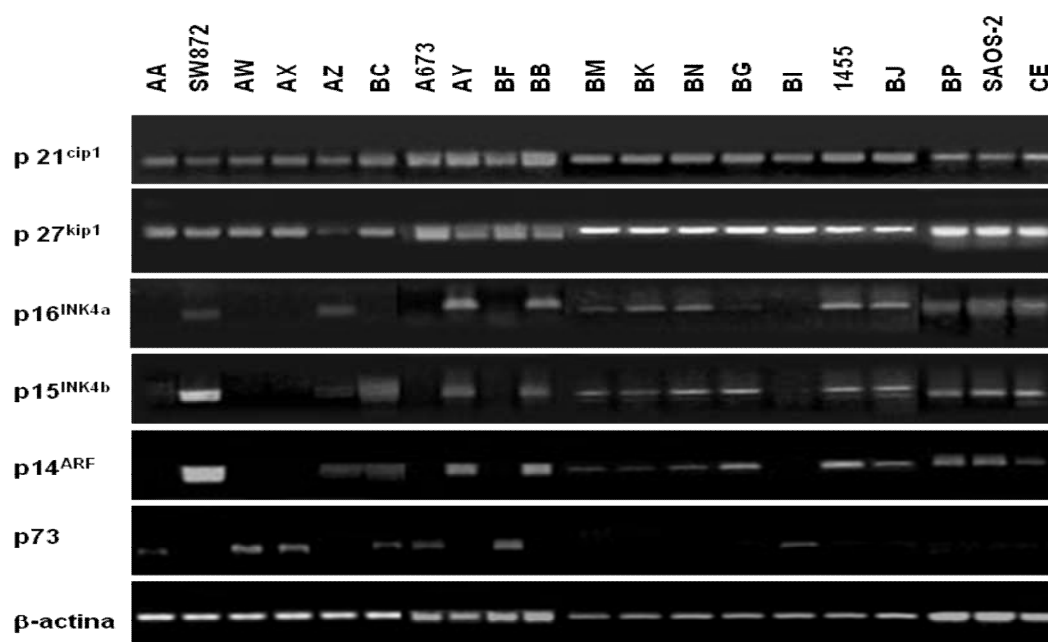


Figura 11. Caracterización de los genes p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p14^{ARF} y p73 por RT-PCR, en el panel de 20 líneas de sarcoma.

P73, es un miembro de la familia de p53 que tiene funciones similares a p53 en el control del ciclo celular y en apoptosis (Nozell et al., 2003; Willis et al., 2003). Nosotros detectamos la pérdida del ARNm de p73 en 13 de las 20 líneas. Además, es interesante resaltar que las líneas que no presentaban transcrito para los genes del locus INK4a/b sí presentaban ARNm para p73, y viceversa (**Figura 11**).

Los MMR son una de las familias de genes de reparación del ADN en mamíferos (Hoeijmakers, 2001, 2007). Se ha descrito que hay una relación directa entre deficiencia de MSH-2 o MLH-1 y tumorigénesis (de Wind et al., 1995). En nuestras líneas observamos que todos expresaban los mismos niveles de transcrito para MLH-1. Sin embargo, se observó una disminución de MSH-2 en CNIO AX y CNIO AZ (**Figura 12**).

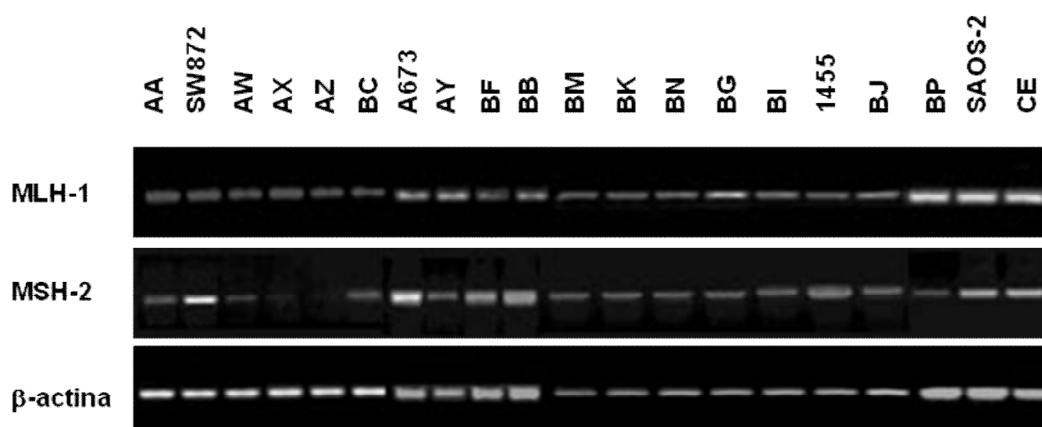


Figura 12. Caracterización de los genes de reparación MMR por RT-PCR, en las líneas de sarcoma.

Aparte de los genes descritos hasta ahora que están implicados en ciclo celular, apoptosis o reparación de ADN, y que están frecuente alterados en cáncer, también analizamos la presencia o ausencia de ARNm de otros genes implicados en cáncer como E-cadherina, β -catenina, APC y Apaf-1. Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión. Aparte del papel en la adhesión celular, β -catenina está considerada como una oncoproteína, y sus niveles citoplasmáticos están regulados por APC que es una proteína supresora de tumores (Kuhnen et al., 2000a; Kuhnen et al., 2000b). En nuestros sarcomas E-cadherina estaba presente en el 50% de las líneas estudiadas. β -catenina presentó transcrito en todas las líneas. En APC se observaron dos bandas una con 718 pb y la otra con 465 pb. Estas bandas son debidas a un splicing alternativo y se expresan por igual (Tsuchiya et al., 2004). Se observó presencia de transcrito en todos los sarcomas excepto en CNIO AZ. Tampoco se observaron alteraciones en la presencia de ARNm de Apaf-1 (**Figura 13**).

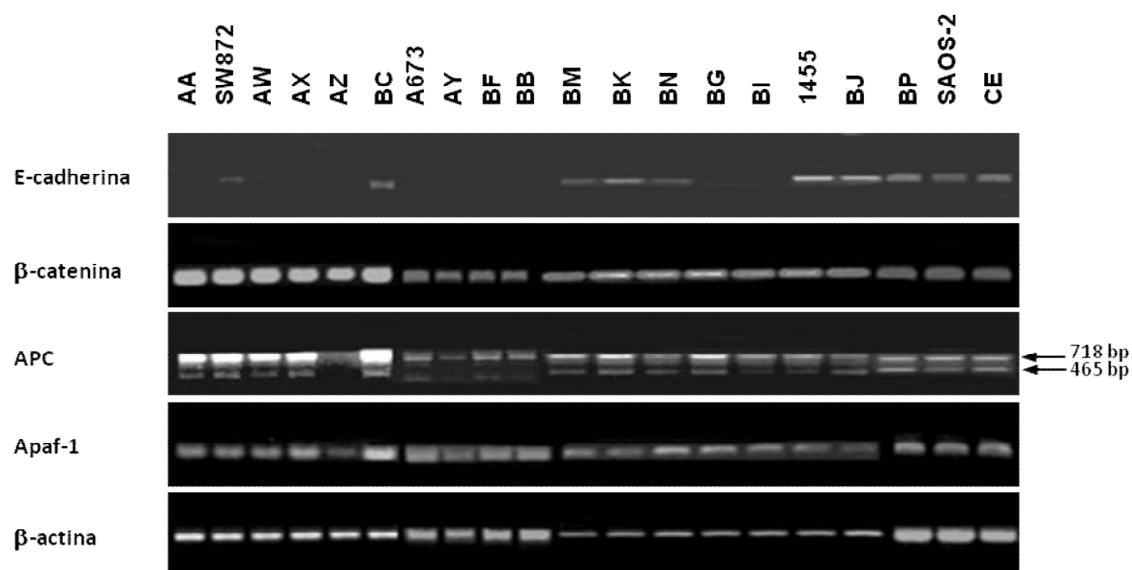


Figura 13. Caracterización de los genes E-cadherina, β -catenina, APC y Apaf-1 por RT-PCR, en el panel de 20 líneas de sarcoma.

4.2.2.2 NIVELES DE PROTEÍNA EN LAS DIFERENTES LÍNEAS PROCEDENTES DE SARCOMAS.

Muchos genes relevantes en cáncer no presentan alteraciones a nivel de mensajero sino que la proteína está modificada por mutación, sobreexpresión o regulación postraslacional. Analizamos diferentes marcadores moleculares a nivel de proteína. Se estudiaron los niveles de ciclina D1, CDK4, MDM2, p53, P27^{Kip1}, pp60^{src}, PDGFR y c-kit fosforilado.

Al analizar los niveles de la proteína ciclina D1 se observó sobreexpresión en 11 líneas de sarcoma (CNIO AZ, CNIO BC, A673, CNIO AY, CNIO BB, CNIO BM, CNIO BK, CNIO BN, CNIO BJ, CNIO BP y CNIO CE). En dos líneas había niveles intermedios (1455, CNIO BG), y en el resto de sarcomas se encontraron niveles basales de proteína que se observan con dificultad (**Figura 14**).

Al estudiar el estado de CDK4 pudimos observar que cinco líneas mostraban sobreexpresión para esta proteína (CNIO BC, A673, CNIO BJ, SAOS-2 y CNIO BN). Por otra parte, analizamos la expresión de MDM2 y observamos que en cinco líneas los niveles de proteína estaban incrementados (CNIO BC, A673, CNIO BJ, CNIO BM y CNIO BN). Cuatro de las cinco líneas que tenían amplificado MDM-2 también tenían sobreexpresión de CDK4. Tanto MDM2 como CDK4 se localizan en 12q13-q15 y su amplificación está descrita en algunos tipos de cáncer (An et al, 1999) (**Figura 14**).

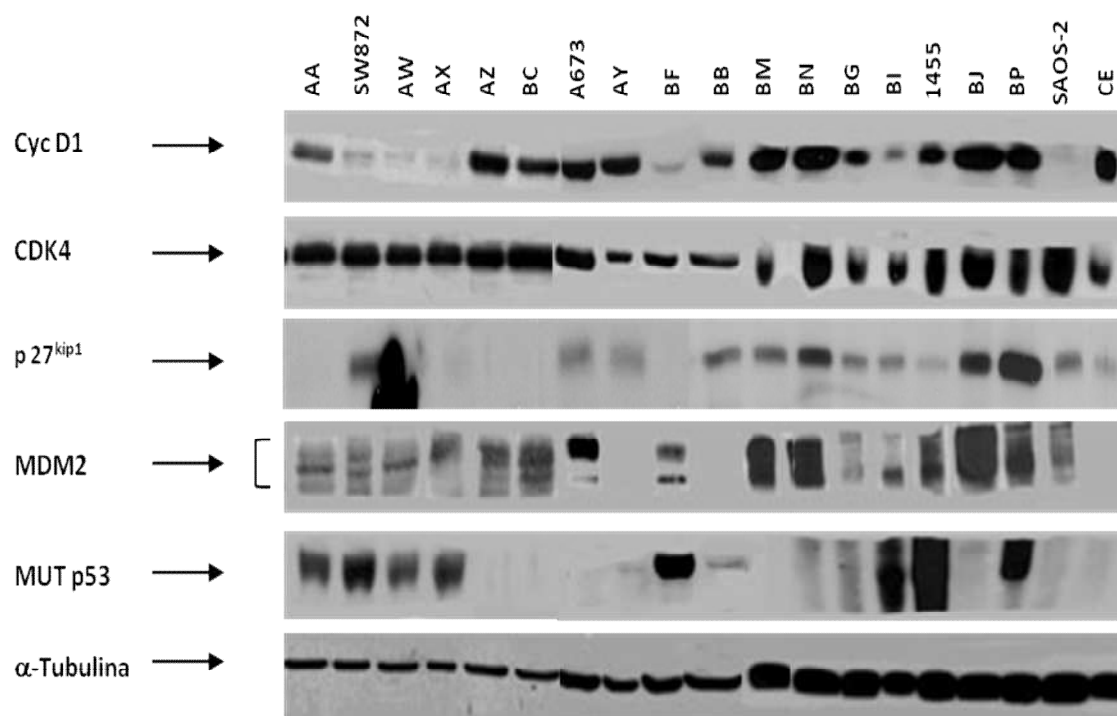


Figura 14. Niveles de las proteínas ciclina D1, CDK4, MDM2 y p53 en las diferentes líneas de sarcoma. Las células se crecieron al 80% de confluencia y se extrajeron los lisados como se detalla en el apartado de material y métodos. Los niveles de la proteína α -tubulina se utilizaron como control de carga.

Al analizar p53, en ocho sarcomas detectamos altos niveles de la proteína. Según lo descrito en la literatura esto podría indicar que en estas líneas p53 puede estar mutado, disminuyendo su degradación y generando una sobreexpresión efectiva (Hinds et al., 1989; Hinds et al., 1990; Nigro et al., 1989). En las líneas con p53 no mutado, su alto índice de degradación hace que no sea detectable en nuestras condiciones experimentales (**Figura 14**).

No obstante, para asegurarnos, analizamos el estado de p53 por secuenciación de su ARNm en cada línea celular. Detectamos mutaciones en p53 en nueve de las veinte líneas celulares (**Tabla 12**), mientras que otras dos mostraron delección en uno o dos de los alelos del gen. La mutación R273H fue la más frecuente, aunque también detectamos en una línea la mutación I251N y en otra, la mutación R175H. Por último, observamos dos casos de polimorfismo R72P. En la mayoría de los casos, encontramos un alelo mutado y el otro wt, indicando que la mutación sólo se produce en uno de los alelos. La línea celular CNIO BP presentó la mutación R175H y el polimorfismo R72P en uno de los alelos y p53 wt en el otro. Las líneas celulares CNIO BG y SAOS2 mostraron delección de ambos alelos de p53. En el resto de las líneas celulares se encontraron sólo transcritos wt.

Tabla 12: Mutaciones de p53 por secuenciación y detención de proteína

LINEA CELULAR	ORIGEN DEL TUMOR	MUTACIONES P53 Secuenciación	MUTACIONES P53 Detención proteína
CNIO AW	Liposarcoma	R273H	+
CNIO AX	Liposarcoma	R273H	+
SW872	Liposarcoma	I251N	+
1455	Liposarcoma	R72P	+
CNIO AA	Leiomiomasarcoma	R273H	+
CNIO BF	Osteosarcoma	R273H	+
CNIO BP	Osteosarcoma	R72P,R175H	+
SAOS-2	Osteosarcoma	Del	-
CNIO BG	Fibrosarcoma	Del	-
CNIO BI	GIST	R273H	+
A673	Sarcoma de Ewing	WT	-
CNIO AZ	Tumor fibroso	WT	-
CNIO AY	Leiomiomasarcoma	WT	-
CNIO BC	MPNST	WT	-
CNIO BB	MPNST	WT	-
CNIO BJ	Osteosarcoma	WT	-
CNIO BM	Hibernoma	WT	-
CNIO BN	Fibrohistiocitoma	WT	-
CNIO CE	Rabdomiosarcoma	WT	-

Al estudiar el estado de p27^{KIP1} se observaron tres niveles de expresión de proteína: bajo cuando la relación de p27^{KIP1}/α-tubulina es inferior a 0.5; medio, cuando varía desde 0.5 a 1.5; y alto, cuando es mayor de 1.5 (**Figura 14**).

Los receptores tirosina quinasa constituyen una de las mayores familias de oncogenes. Estos receptores tienen un papel fundamental en procesos celulares como ciclo celular, migración, metabolismo, supervivencia, proliferación y diferenciación. Su actividad está muy regulada en células normales pero pueden sufrir mutaciones o sobreexpresión dando lugar a una activación constitutiva, facilitando la transformación maligna (Schlessinger, 2000).

En el presente trabajo estudiamos la presencia de c-Kit fosforilado en nuestras líneas celulares por inmunoprecipitación y western blot, así como los niveles de la proteína PDGFR fosforilada por Western-blot. Pudimos observar que las líneas celulares CNIO AZ, CNIO BF y CNIO BI, expresan constitutivamente el receptor c-kit fosforilado. En el caso de PDGFR, se observó que en ocho líneas había sobreexpresión, en siete sarcomas había niveles intermedios, y en el resto de las líneas celulares se encontraron niveles basales (**Figura 15**).

También analizamos el estado de fosforilación de la proteína Src, que es un miembro de la familia de tirosina quinasa no receptores que se localiza a nivel de citoplasma. Niveles elevados de esta proteína se han descrito en un gran número de tumores (Ishizawa and

Parsons, 2004). En nuestro trabajo observamos que en siete de las veinte líneas celulares estaban aumentados los niveles de fosforilación de Src.

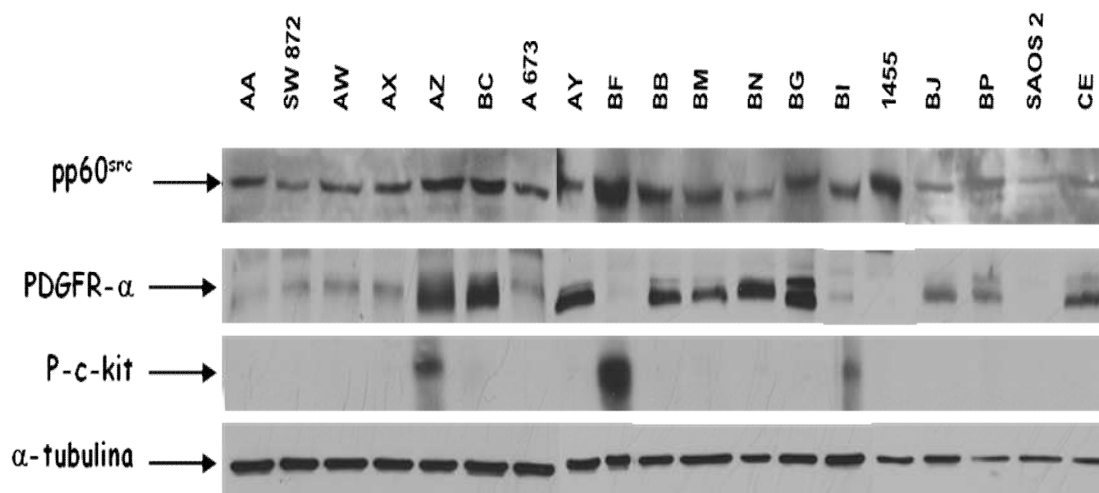


Figura 15. Niveles de las proteínas pp60src, PDGFR- α y p-c-KIT en las diferentes líneas de sarcoma. Las células se crecieron al 80% de confluencia y se extrajeron los lisados como se detalla en el apartado de material y métodos. p-c-kit se analizó por western blot tras inmunoprecipitación. Los niveles de la proteína α -tubulina se utilizaron como control de carga.

4.2.2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA RUTA PI3K.

La ruta de PI3K es importante en supervivencia celular y resistencia a fármacos (West et al., 2002). En primer lugar estudiamos la presencia de los transcritos de p85 α (subunidad reguladora de PI3K) y PTEN. Observamos transcritos de PTEN y p85 α en todas las líneas de sarcoma (**Figura 16A**). También analizamos los niveles de proteína de PTEN, y observamos que había diferentes niveles de expresión. En cinco líneas (AA, SW872, AW, AX y BI) no se encontró expresión para esta proteína indicando que la ruta puede estar alterada (Cantley, 2002; Vivanco and Sawyers, 2002) (**Figura 16B**).

Excepto por la desaparición de PTEN en cinco sarcomas, el resto de datos no nos daba información sobre el estado de la ruta. Por ello estudiamos el estado de la misma en diferentes condiciones para determinar si existía activación constitutiva. Hemos analizado la fosforilación de AKT en Ser 473 como marcador del estatus de esta vía (Cardone et al., 1998; Datta et al., 1997). Se sabe que, al crecer las células en bajo porcentaje de suero hay una disminución de los niveles de AKT fosforilado y que estos niveles de fosforilación pueden mantenerse elevados cuando existen alteraciones en la ruta de PTEN/PI3K

(Kauffmann-Zeh et al., 1997; Krystal et al., 2002; Link et al., 2005). Cultivamos las células en presencia de 0.5% de suero durante 24 horas para comparar los niveles de AKT fosforilado respecto a las células crecidas con 10% de suero. Observamos que en 14 líneas se mantenía la fosforilación en las muestras crecidas a bajo suero lo que podría indicar que en estas líneas la vía estaba constitutivamente activa (**Figura 17**).

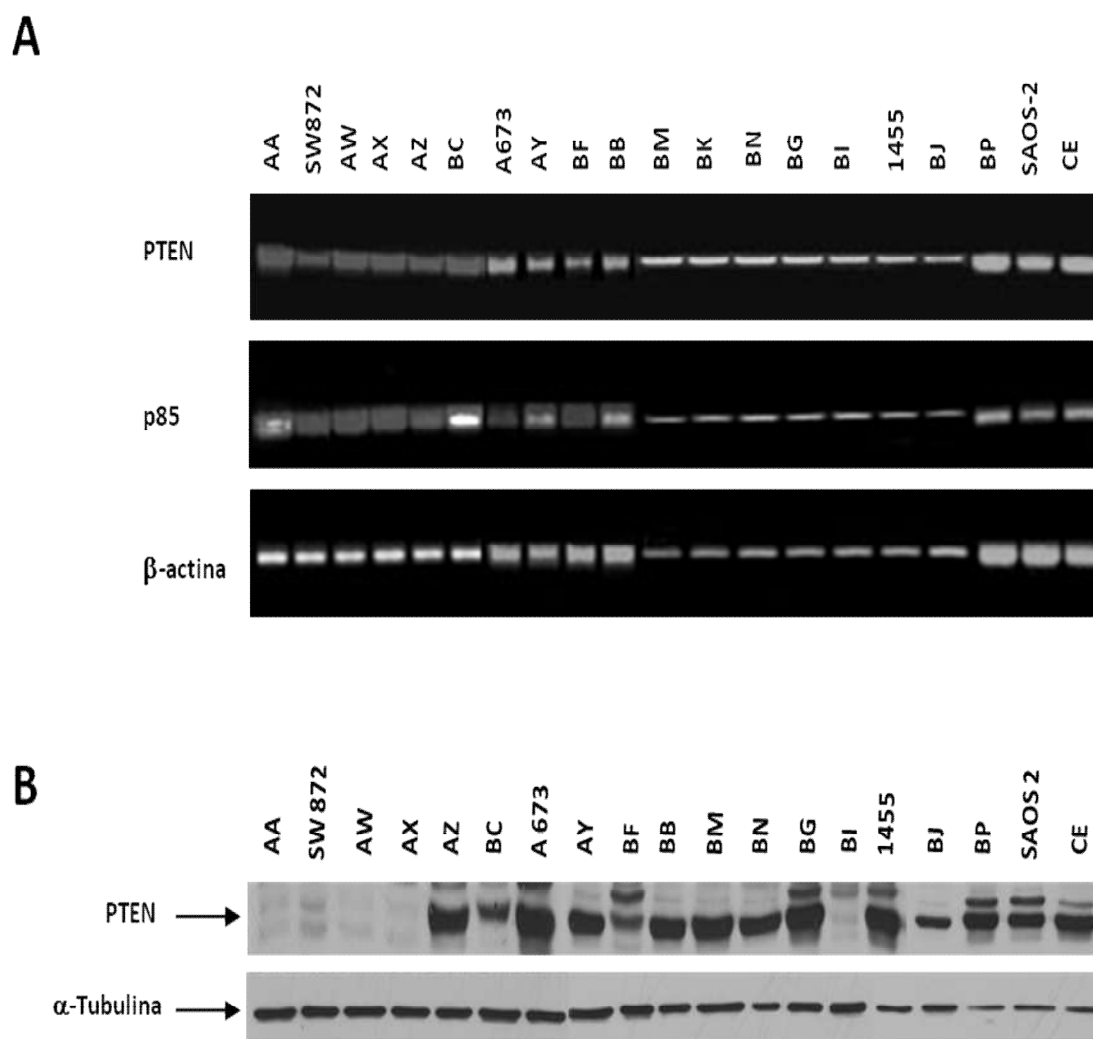


Figura 16. A. Caracterización de los genes PTEN y P85 por RT-PCR en las diferentes líneas de sarcoma. **B.** Niveles de proteína PTEN.

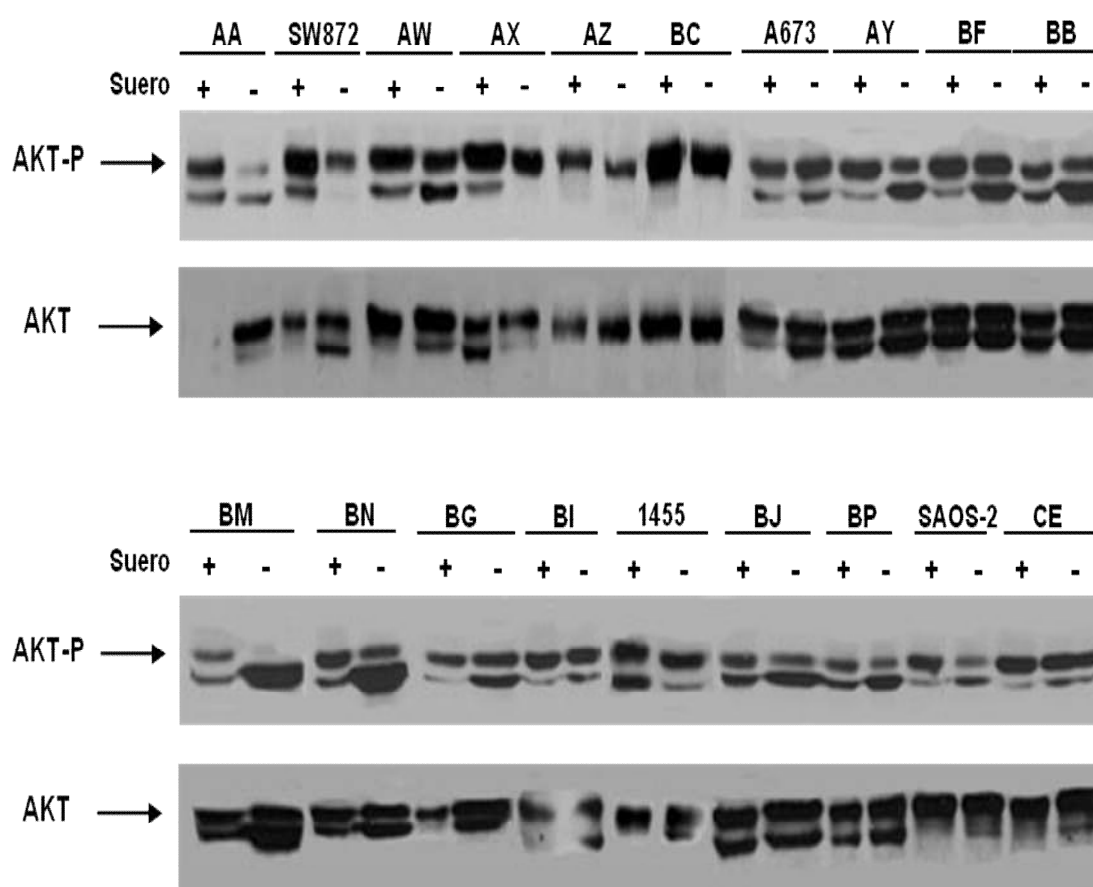


Figura 17. Caracterización de la activación constitutiva de la ruta PI3K. Las células se mantuvieron durante 24h en dos concentraciones diferentes de suero: 10% (+) y 0.5% (-). Los lisados se extrajeron como se detalla en el apartado de materiales y métodos, el Western Blot se hizo con anti-AKT (Ser 473) y AKT total como control.

4.2.3 CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS LÍNEAS DE SARCOMA.

Estudiamos los perfiles de sensibilidad y resistencia de las líneas celulares establecidas para un total de 12 fármacos conocidos. Los compuestos fueron analizados como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las células se sembraron 24 horas antes de añadir los compuestos, que se mantuvieron 96 horas en el cultivo. Los ensayos se cuantificaron con el método de MTT (Denizot and Lang, 1986; Mosmann, 1983). **(Figura 18).**

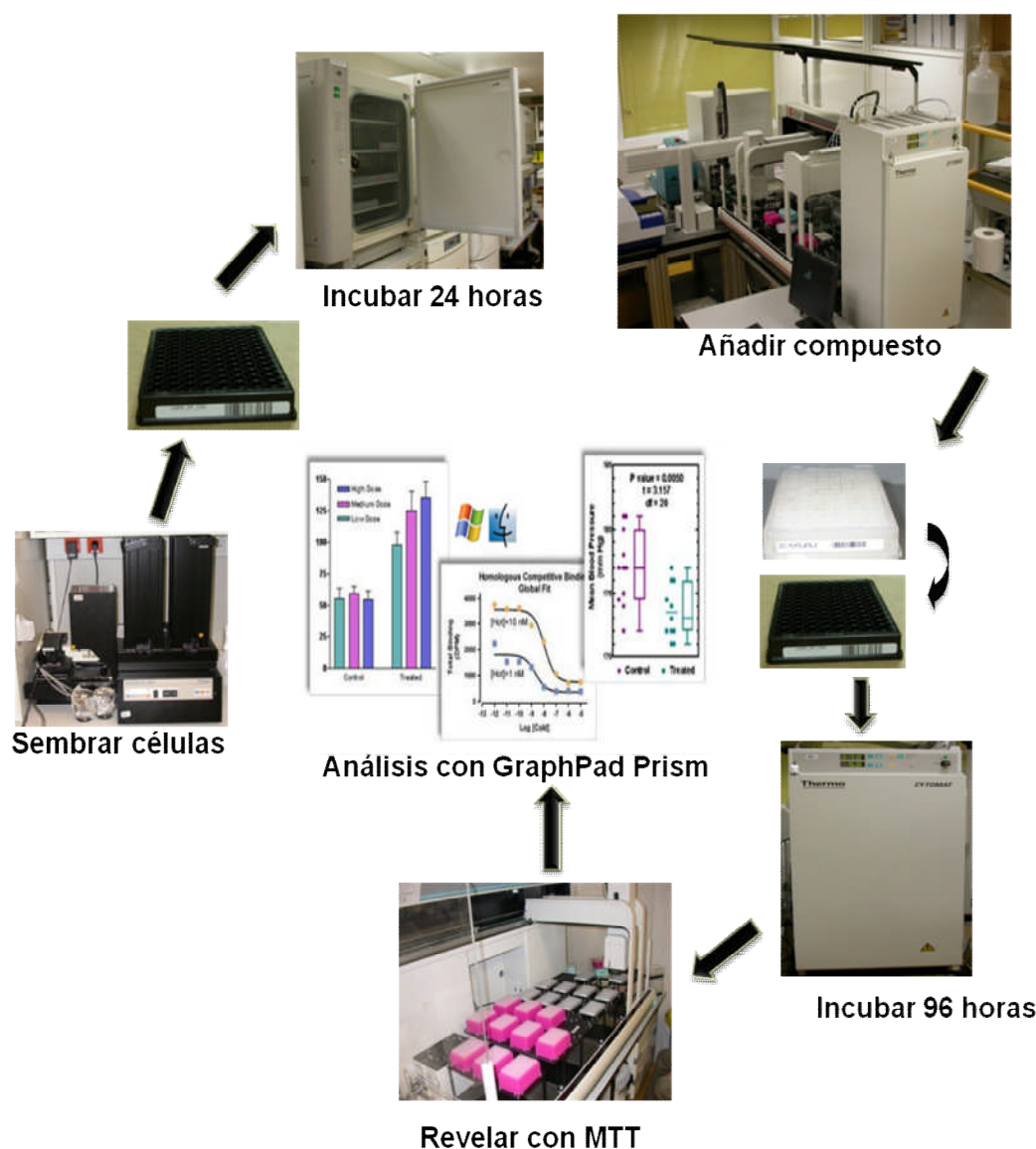


Figura 18. Esquema de la metodología seguida, para los ensayos de citotoxicidad.

Medimos la respuesta de las diferentes líneas a gemcitabina. Las células mostraron tres respuestas diferentes al tratamiento. Aproximadamente el 50% de las líneas celulares fueron sensibles a gemcitabina con valores de IC50 menores a 15 nM. Un segundo grupo de líneas celulares fueron resistentes al compuesto, con un IC50 mayor a 100 nM. Finalmente un tercer grupo tiene una resistencia intermedia al fármaco, con un IC50 entre 20-30 nM (**Tabla 13**). Todas las líneas, excepto CNIO BB, presentaron resistencia a Cis-platino. La respuesta de las líneas a oxaliplatino se dividía en tres grupos: más del 50% de las líneas fueron sensibles con IC50 menor de 5 μ M, dos mostraron resistencia intermedia a oxaliplatino con un IC50 entorno a 20 μ M, y el resto fueron resistentes al fármaco. Se observaron dos grupos en cuanto a su comportamiento frente a camptotecina. En torno al 50% mostraron una IC50 menor a 30 nM, mientras las

resistentes tuvieron un IC50 mayor de 50 nM. En cuanto a la respuesta a doxorubicina, aproximadamente el 50% de las líneas fueron sensibles con un IC50 menor a 50 nM (**Tabla 13**).

Tabla 13: Sensibilidad del panel de líneas de sarcoma a gemcitabina, cis-platino, oxaliplatino, camptotecina y doxorubicina.

LINEAS CELULARES	Gemcitabina (nM)	Cis-platino (μ M)	Oxaliplatino (μ M)	Camptotecina (nM)	Doxorubicina (nM)
CNIO AW	18.5	>300	4.02	30.8	45
CNIO AX	8.9	>100	3.37	18.9	44
SW872	11.93	>300	>50	14.2	>300
1455	8.43	>100	2.86	29.3	>300
CNIO AA	5.3	>100	3.03	17.7	21.5
CNIO AY	65.6	>100	0.5	>50	44
CNIO AZ	4.4	>300	>50	>50	14
CNIO BC	34	>300	>50	24.5	>300
CNIO BB	>100	0.35	>50	>50	232
A673	7.2	>100	>50	>50	50
CNIO BJ	>300	>300	0.7	>50	>300
CNIO BF	12.6	>300	16.97	38.3	15
CNIO BP	7.5	>100	2.45	27.43	>300
SAOS-2	23	>100	21.28	100	>300
CNIO BG	5.78	>100	1.5	13.54	22
CNIO BM	>300	>300	>50	>100	>300
CNIO BN	>300	>100	1.45	>100	>300
CNIO CE	>300	>100	0.8	>50	>300
CNIO BI	10.9	>300	2.9	>100	50

Frente al antimitótico taxol, más del 50% de las líneas fueron sensibles con un IC50 menor a 5 nM. Dos líneas presentaron sensibilidad intermedia con un IC50 entorno a 20 nM y el resto fueron resistentes con un IC50 mayor de 100 nM (**Tabla 14**). Frente a Vinblastina, 11 líneas fueron sensibles con un IC50 menor de 15 nM.

En ocho líneas el IC50 de flavopiridol fue menor de 10 nM, el resto de las líneas presentaron un IC50 mayor de 15 nM. UCN-01 en 11 líneas presentó un IC50 menor de 0.1 μ M, cinco líneas presentaron sensibilidad intermedia con IC50 cercano a 0.1 μ M, y el resto presentó un IC50 próximo a 1 μ M. CNIO BM tuvo incluso un IC50 mayor de 10 μ M (**Tabla 14**).

Tabla 14. Sensibilidad del panel de líneas de sarcoma a taxol, vinblastina, flavopiridol, UCN-01, imatinib, rapamicina y LY-294002.

LÍNEAS CELULARES	Taxol (nM)	Vinblastina (nM)	Flavopiridol (nM)	UCN-01 (μM)	Imatinib (μM)	Rapamicina (nM)	LY-294002 (μM)
CNIO AW	7.44	13.73	29.08	0.09	>100	0.64	15.66
CNIO AX	16.4	>100	17.85	0.11	>100	0.16	6.8
SW872	5.76	>100	9.6	0.052	39.4	0.7	7.46
1455	2.7	6.3	6.75	0.016	30.33	0.22	5.62
CNIO AA	1.67	6.3	6	0.158	61.58	0.5	6.99
CNIO AY	6.3	13.6	4.1	0.05	>100	0.12	19.14
CNIO AZ	>100	10.87	5	0.13	>100	18.3	6.84
CNIO BC	>100	25.16	15.85	0.05	>100	4.89	>100
CNIO BB	>100	>100	23.7	0.041	>100	1.27	>100
A673	2.8	7.9	12	0.87	>100	>100	6.45
CNIO BJ	5.6	19.06	6.8	0.078	28.49	>100	>100
CNIO BF	18.8	>100	33.1	0.1	>100	0.3	8.76
CNIO BP	21.5	4.83	26	0.124	37.04	2.68	12.13
SAOS-2	2.19	5.56	3.8	0.031	>100	1.24	75.72
CNIO BG	5	6.58	24.5	0.05	31.57	>100	6.28
CNIO BM	>100	>100	>100	>10	>100	>100	27
CNIO BN	>100	>100	2.85	0.024	54.01	0.52	2.17
CNIO CE	>100	>100	17.5	0.05	>100	>100	5.8
CNIO BI	3.1	13.09	22.5	0.42	21.31	0.5	22.19

4.3 ANÁLISIS DE DETERMINANTES DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS

Todos los datos obtenidos de respuesta a compuestos antitumorales y alteraciones moleculares en las veinte líneas de sarcoma se analizaron mediante un algoritmo informático que nos permitía cuantificar las correlaciones entre los dos grupos de datos para identificar genes implicados en el mecanismo de acción de las compuestos o posibles biomarcadores de su actividad farmacológica.

Utilizamos un modelo Cox univariable para analizar la relación entre las IC50 y los biomarcadores. Partimos de veinte líneas celulares de origen mesenquimal que estaban caracterizadas para 14 genes a nivel de mensajero y 10 genes a nivel de proteína. Los datos de los genes p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, MSH2, MLH1, PTEN, P85 y β-Catenina, Apaf-1 y APC se eliminaron porque tenían valores constantes no influyendo en la respuesta. Asimismo los datos de respuesta a cisplatino en todas las líneas excepto en una son iguales por lo que también se eliminaron. Finalmente nos quedamos con 20 líneas, 16 marcadores y 11 compuestos.

Establecimos la presencia o ausencia de los diferentes marcadores como 1 ó 0 para ARNm (Tabla 15). En proteínas incluimos niveles intermedios dependiendo de los niveles

relativos de proteína observados (**Tabla 16**). Nuestra intención fue hacer un rango de marcadores discreto para que fuera fácil medirlo en muestras clínicas.

Tabla 15. Valores discretos utilizados para el programa de análisis de correlaciones. La presencia o ausencia de los marcadores para RT-PCR se establecieron como 1 ó 0.

	CNIO AW	CNIO AX	SW872	1455	CNIO AA	CNIO AY	CNIO AZ	CNIO BC	A673	CNIO BB	CNIO BJ	CNIO BF	CNIO BP	SAOS2	CNIO BG	CNIO BM	CNIO BN	CNIO CE	CNIO BI
P21 ^{cip}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P27 ^{kip1}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P16 ^{INK4}	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
P15 ^{INK4}	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
P14 ^{ARF}	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
MSH2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MLH1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Apaf-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P73	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
PTEN	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P85	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
E-Caderina	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0
β-catenina	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
APC	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 16. Valores discretos a nivel de proteína para el programa de análisis de correlaciones. En este caso se establecieron niveles intermedios.

	CNIO AW	CNIO AX	SW872	1455	CNIO AA	CNIO AY	CNIO AZ	CNIO BC	A673	CNIO BB	CNIO BJ	CNIO BF	CNIO BP	SAOS2	CNIO BG	CNIO BM	CNIO BN	CNIO CE	CNIO BI
P53	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
MDM2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
CDK4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
Cyc D1	0	0	0	0.5	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0.5	1	1	1	0
P27	1	1	2	0.5	0.5	0.5	1	2	1	2	1	0.5	2	1	0.5	1	1	1	1
P60 ^{src}	1	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1
PDGFR-α	0.5	0.5	0.5	0	0	1	1	1	1	0.5	0.5	0	0.5	0	1	1	1	1	0.5
P-C-KIT	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
PTEN	0	0	0	3	0	2	3	1	2	3	1	1	2	2	3	2	2	2	0
AKT-P	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1

Para cada compuesto se hicieron 15 modelos Cox, uno para cada marcador. En los casos de p16^{INK4a} y p14^{ARF} sólo se utilizó uno porque tenían patrones idénticos. Basado en el modelo Cox, para cada compuesto podemos saber como de “relevante” o “importante” es un marcador para la respuesta a dicho compuesto. Además, se incluyó el test de valor-p que evalúa el significado estadístico de los resultados de la correlación.

Aplicando este análisis estadístico a todos los marcadores obtuvimos los resultados mostrados en la **(Tabla 17)**. La tabla muestra el valor de sensibilidad a un tratamiento específico para cada marcador. Sólo se muestran valores con relevancia estadística para cada tratamiento. Un coeficiente positivo significa que el incremento del marcador está asociado con una disminución del IC50, y viceversa, un valor negativo significa que el aumento del marcador está asociado con valores más altos de IC50.

Tabla 17. Valores de correlación para cada marcador de sensibilidad a un tratamiento específico.

	P15 ^{ink4b}	P16 ^{ink4a}	P14 ^{ARF}	P73	E-cadherina	P53	MDM2	CDK4	Ciclina D1	P27 ^{kip1}	P60-src	PDGFR-α	ckit-p	PTEN	P
Doxorrubicina	-1.91	-1.36	-1.36	1.36	-27.36		-1.57	-1.57					1.77		>0.05
Gemcitabina	-1.27	-1.03	-1.03	1.03	-1.02	2.12			-1.08	-1.29				-2.56	>0.05
Oxaliplatino											-1.1				>0.1
Camptothecina						2.55			-1.19	-1.82					>0.05
UCN-01															>0.05
Flavopiridol								1.45							>0.05
Taxol						1.73			-1.33			-2.66			>0.05
Imatinib															
Rapamicina						1.2	-1.34		-1.54						>0.05
Vinblastina									2.25						>0.05
LY294002														-2.07	>0.05

Se muestran valores con relevancia estadística para cada tratamiento. Un coeficiente positivo significa que el incremento del marcador está asociado con una disminución del IC50. Un valor negativo significa que el aumento del marcador está asociado con valores más altos de IC50.

En primer lugar comprobamos la correlación entre marcadores e IC50 de compuestos conocidos y mecanismos de acción discretos. La sensibilidad a flavopiridol muestra relación con los niveles de CDK4, siendo más sensibles las líneas celulares que tienen altos niveles de CDK4. Esta relación fue descrita por Lu y colaboradores (Lu et al., 2000). Estos autores describen que hay una gran variabilidad en la expresión de componentes de ciclo celular en las líneas celulares resultando CDK4 como predictor de respuesta a agentes de ciclo celular.

En varios compuestos como gemcitabina, camptotecina, taxol y rapamicina, encontramos una relación entre la sensibilidad a dichos compuestos y estado de p53. Observamos que cuando p53 estaba mutado las células eran más sensibles a los diferentes compuestos. Sin embargo hay controversia en lo descrito en la literatura sobre el estado de p53 y sensibilidad a estos compuestos. Por ejemplo, tanto Galmarini y colaboradores (Galmarini et al., 2002) como Chen y colaboradores (Chen et al., 2000) observan mayor sensibilidad a gemcitabina en líneas celulares con p53 wt, sin embargo Kielb (Kielb et al., 2001), concluyen que el efecto de gemcitabina es independiente de p53. Gang Li (Li et al., 2000), Zheng M (Zheng et al., 1999) y Li G (Li et al., 1998) observaron que las líneas celulares con p53 funcional eran más sensibles a camptotecina que las que tenían p53 mutado, sin embargo Tomicic (Tomicic et al., 2005), Yinglin Wang (Wang et al., 2004) y RH te Poele (te Poele and Joel, 1999), describen en sus trabajos que las células sin p53 funcional eran más sensibles al metabolito activo de la camptotecina. Es posible que parte de la respuesta en función de p53 dependa del tejido de origen de la línea celular.

Respecto a Taxol, nuestros resultados coinciden con los observados por varios autores (Kielb et al., 2001; Kurschat and Mauch, 2000) que proponen que las células con p53 no funcional son más sensibles a taxol. Incluso en ensayos clínicos en combinación de taxol y carboplatino, Ueno y colaboradores (Ueno et al., 2006) describen que el riesgo de muerte y de progresión del tumor en pacientes que sufrían carcinomas no serosos de ovario tratados con estas compuestos era menor cuando los pacientes tenían p53 mutado.

Nuestros datos muestran una clara relación entre sensibilidad a doxorubicina y presencia de transcrito de E-cadherina (**Figura 19**), siendo mucho más resistentes al fármaco las células que expresan el gen y viceversa. Actualmente no tenemos evidencias de que dicha relación sea causal ni de que intervenga en el mecanismo de acción de doxorubicina.

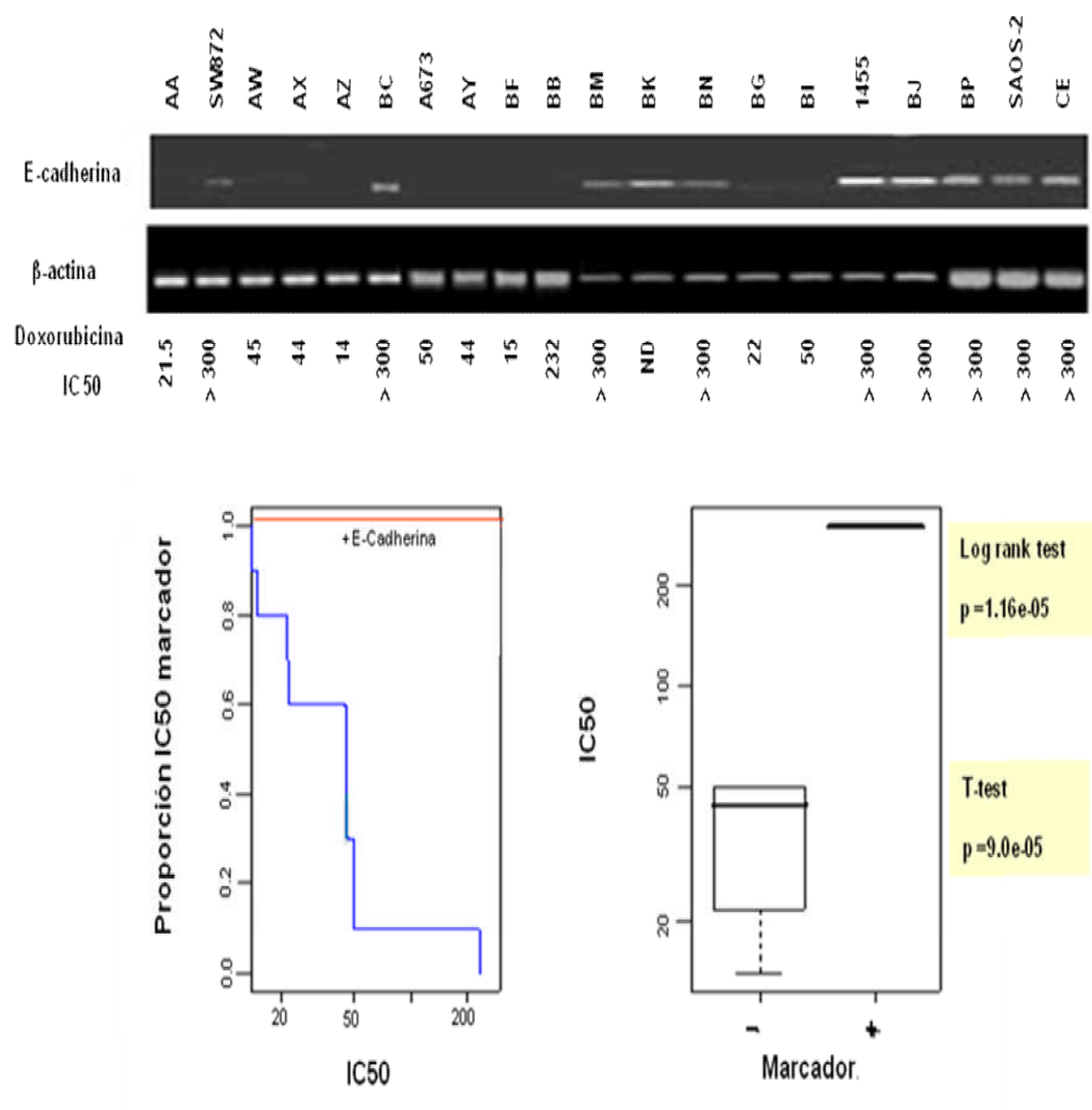


Figura 19. Relación de la presencia de E-cadherina realizada con RT-PCR y el IC50 de Doxorubicina. Las figuras muestran gráficas de supervivencia usando la estimación de Kaplan-Meier, con el valor p obtenido del test log-rank, y con t-test.

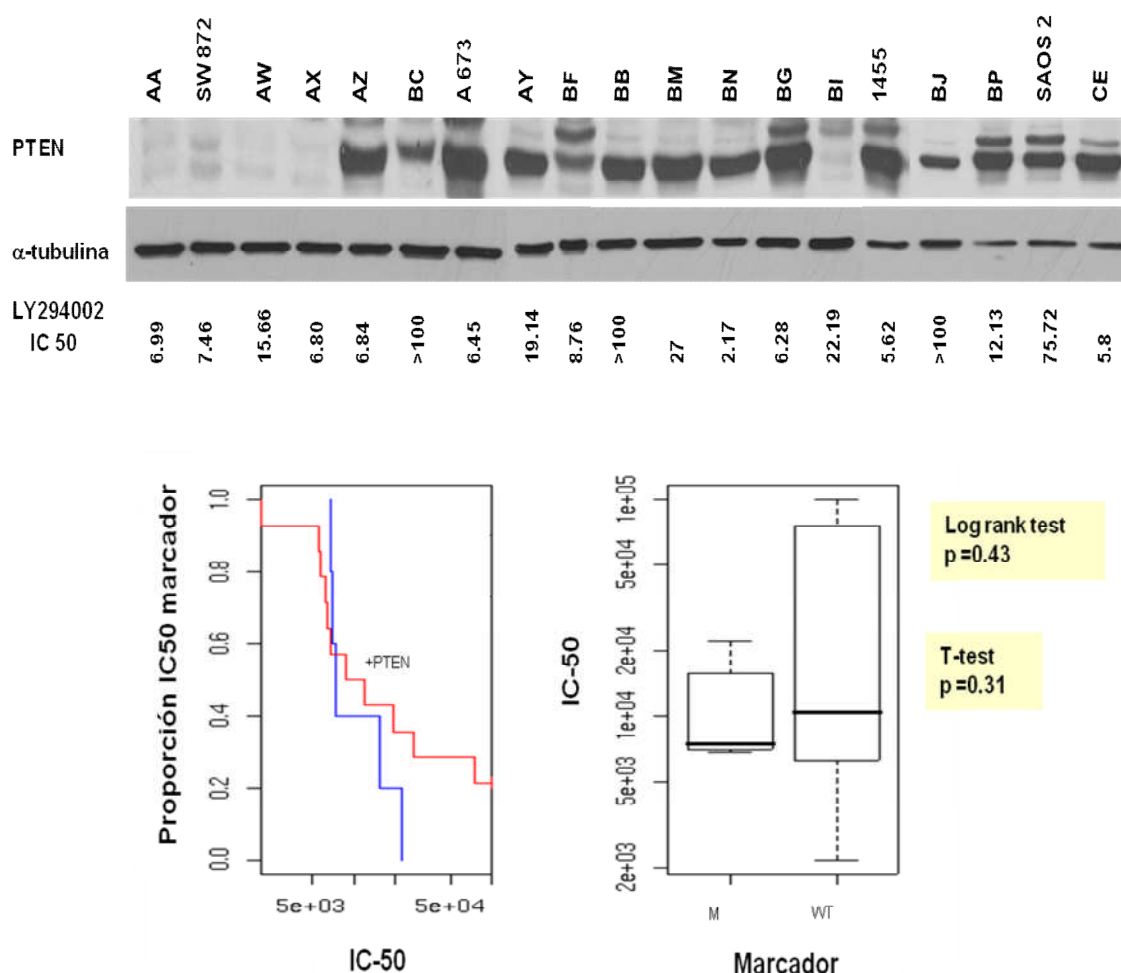


Figura 20 Relación entre presencia de la proteína PTEN y sensibilidad a LY294002E. Las figuras muestran gráficas de supervivencia usando la estimación de Kaplan-Meier, con el valor p obtenido del test log-rank, y con t-test.

Otros compuestos como LY294002, un inhibidor de PI3K, muestran una débil relación con la presencia de PTEN, el supresor de tumores que regula la ruta de PI3K (**Figura 20**). En nuestros datos también observamos una relación entre el aumento del receptor de PDGF- α y resistencia a Taxol. En la literatura está descrito que cuando se realiza un pretratamiento con PDGF hace a las células más resistentes a Taxol (Isonishi et al., 2007). Cuando las células se tratan con inhibidores de PDGF como STI571 aumenta la sensibilidad a taxol (Kim et al., 2004).

Por último, fue interesante descubrir una relación significativa entre el estado fosforilado de p60Src y resistencia a oxaliplatino. Esta relación ha sido previamente propuesta por Gareth (Griffiths et al., 2004) (**Figura 21**).

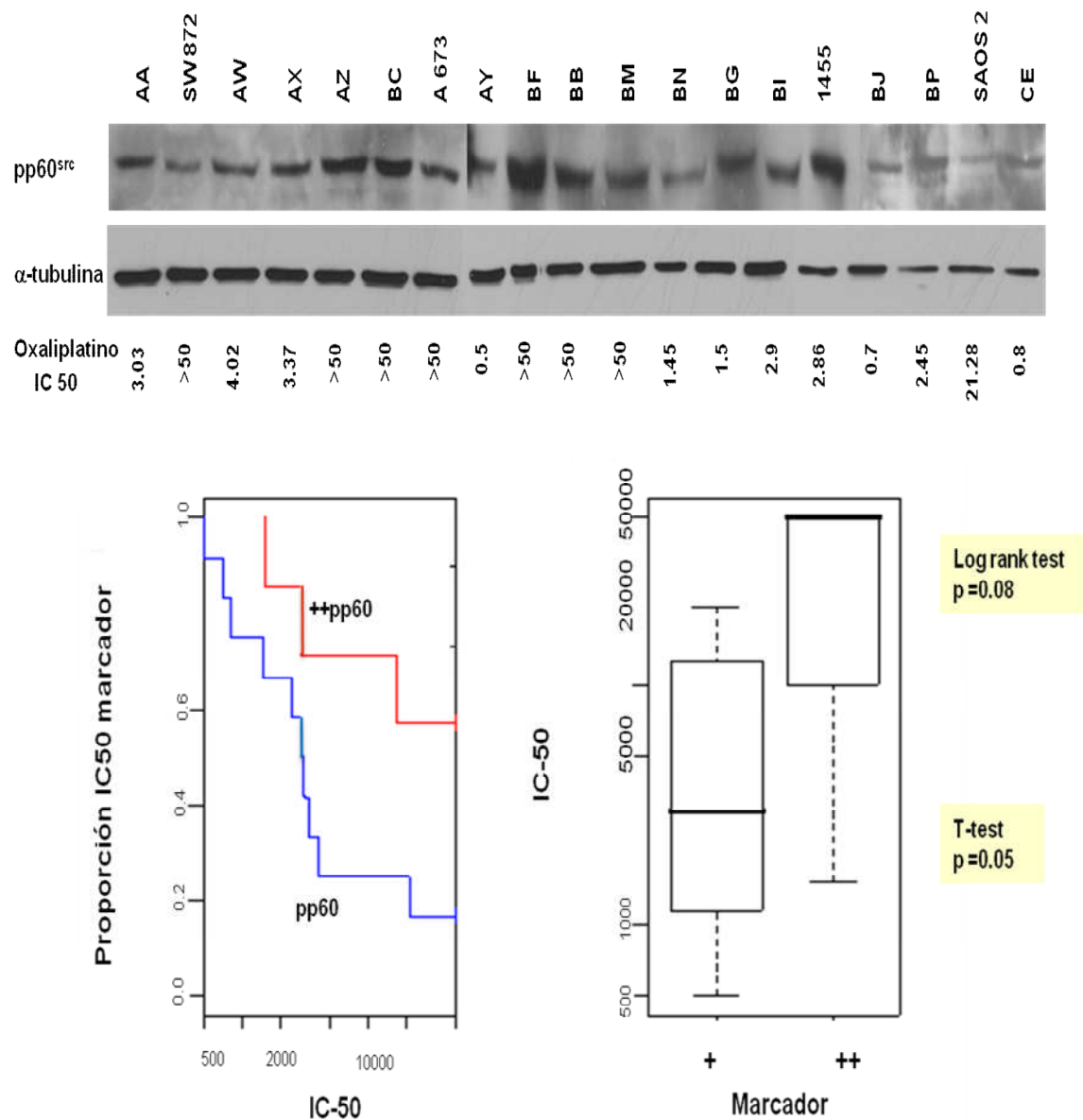


Figura 21. Relación entre niveles de proteína pp60src y Oxaliplatino. Las figuras muestran gráficas de supervivencia usando la estimación de Kaplan-Meier, con el valor p obtenido del test log-rank, y con t-test.

A continuación tratamos las células con Yondelis®, Aplidina® y Zalypsis® (**Tabla 18**).

Tabla 18: Sensibilidad a Yondelis®, Aplidina®, Zalypsis® en el panel de líneas de sarcoma a bajo pase.

Línea celular	Origen del tumor	Yondelis® (nM)	Aplidina® (nM)	Zalypsis® (nM)
CNIO AW	Liposarcoma	0.7	2.33	0.16
CNIO AX	Liposarcoma	0.7	2.25	0.32
SW872	Liposarcoma	0.5	33.14	0.87
1455	Liposarcoma	0.1	0.89	0.34
CNIO AA	Leiomioma	0.4	0.27	0.5
CNIO AY	Leiomioma	9	3.85	2580
CNIO AZ	Tumor fibroso	5	2.83	870
CNIO BC	MPNST	>100	35.65	664
CNIO BB	MPNST	>100	8.22	1008
A673	Sarcoma de Ewing	1	17.09	0.42
CNIO BJ	Osteosarcoma	2	17.21	103
CNIO BF	Osteosarcoma	0.3	1.59	501
CNIO BP	Osteosarcoma	0.3	7.86	0.29
SAOS-2	Osteosarcoma	0.11	1.93	0.94
CNIO BG	Fibrosarcoma	0.3	0.92	1200
CNIO BM	Hibernoma	10	12.67	3473
CNIO BN	Fibrohistiocitoma	>100	6.44	4750
CNIO CE	Rabdomiosarcoma	>100	1.21	2401
CNIO BI	GIST	0.1	1.0	4933

Aplicamos los mismos algoritmos de correlación a los resultados obtenidos con los compuestos antitumorales de origen marino Yondelis®, Aplidina® y Zalypsis®, que tienen actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares humanas *in vitro* e *in vivo*, incluyendo líneas celulares resistentes a otros agentes quimioterápicos. La aplicación de nuestro algoritmo de análisis nos permitió establecer una importante correlación entre ausencia de función de p53 y sensibilidad a Yondelis®. Con Aplidina®, descubrimos una significativa correlación entre altos niveles de p27^{KIP1} y resistencia al compuesto. Estos datos serán estudiados en detalle más adelante (Ver apartados 5.4 y 5.5). Y por último, observamos correlación entre sensibilidad a Zalypsis® y bajos niveles del receptor PDGFR- α . En este último caso, cuando se incluye en el análisis la fosforilación constitutiva de c-kit se incrementa el significado estadístico de la correlación (**Figura 22**).

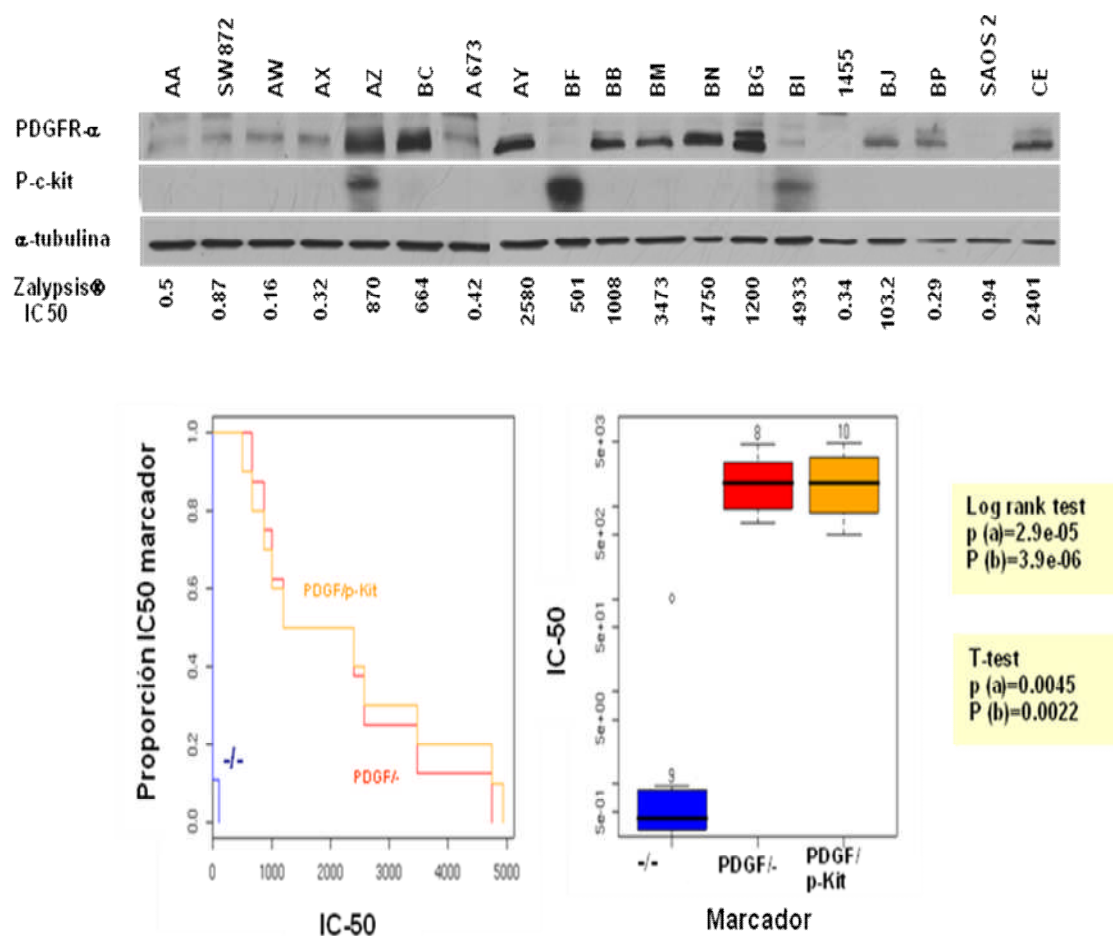


Figura 22. Relación entre sensibilidad a Zalypsis® y bajos niveles del receptor PDGF-α. Cuando se combina la presencia de fosforilación constitutiva de c-kit se incrementa el significado estadístico de la correlación.

Por lo tanto, identificamos que altos niveles de expresión de PDGFRα están relacionados con resistencia a Zalypsis®. Con el objetivo de validar este marcador *in vivo*, generamos xenotransplantes para diferentes líneas celulares con altos y bajos niveles de PDGFRα. Las líneas celulares HGC-27, SW1990 y A2780 mostraron altos niveles de PDGFRα, mientras que las líneas celulares UM-UC-3, SKOV-3, MX-1, MDA-MB-231, CALU-6 y HepG2 presentaron bajos niveles de PDGFRα (**Figura 23**). Utilizamos estas líneas celulares porque las de sarcoma utilizadas en este trabajo para predecir la respuesta de los diferentes compuestos, no presentan crecimiento exponencial en ratones inmunodeprimidos. Los xenotransplantes fueron tratados con 0.3 mg/kg/día Qdx5x2 o 0.9 mg/Kg/día Qdx7x3. Consideramos que había una respuesta positiva cuando el volumen tumoral se reduce en un 60% respecto al control.

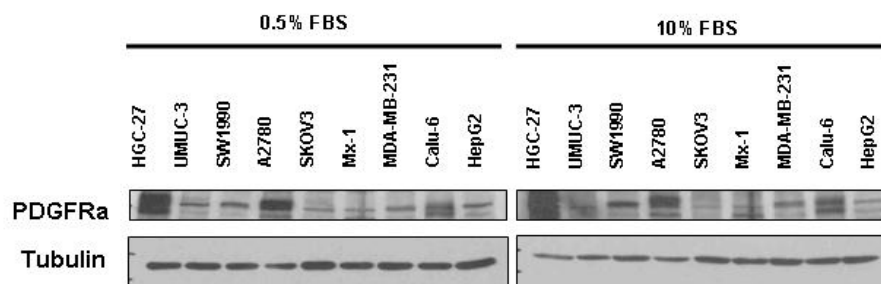


Figura 23. Caracterización de los niveles de proteína PDGFRα en las líneas celulares utilizadas en xenotransplantes.

Todas las líneas respondieron al tratamiento excepto HGC-27, SW1990, SKOV-3 y A2780 (**Figura 24**). De estas líneas celulares SKOV-3 era la única que no expresaba altos niveles de PDGFRα aunque, a diferencia del resto de líneas, presentaba altos niveles de EGFR activado (Datos no mostrados).

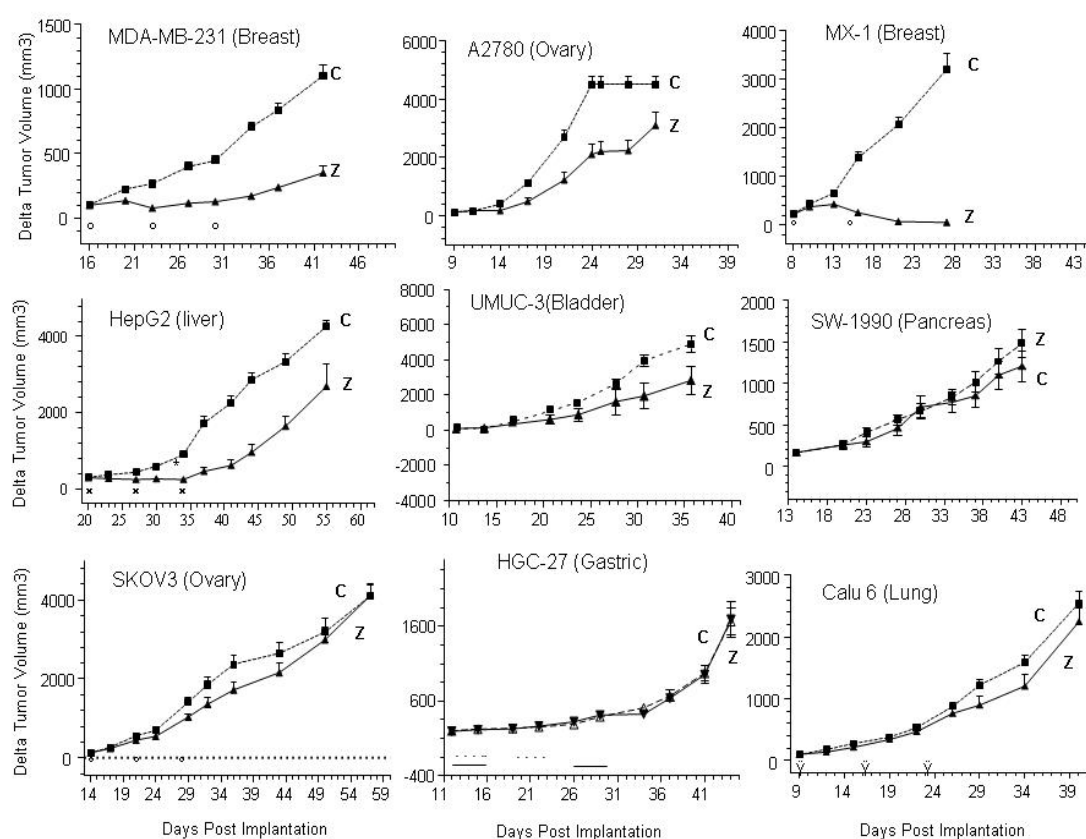


Figura 24. Respuesta a Zalypsis® en xenotransplantes.

De los tres compuestos estudiados nos centramos en Yondelis® y Aplidina® para demostrar la causalidad de las relaciones encontradas.

4.4 LA SENSIBILIDAD A YONDELIS® CORRELACIONA CON LA FUNCIONALIDAD DE P53

4.4.1 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Evaluamos la respuesta de las diferentes líneas celulares a Yondelis®. En base a la sensibilidad o resistencia frente al compuesto, se podrían diferenciar dos grupos. El primero, más sensible con un IC50 menor de 1 nM, y el segundo más resistente, con IC50 mayor de 1 nM, incluidas cuatro líneas con IC50 mayor de 100 nM. La línea celular A673, no se pudo adscribir a ninguno de los grupos, ya que mostró resistencia intermedia a Yondelis®, con un IC50 de 1 nM (**Tabla 19**).

Tabla 19. Respuesta de las líneas celulares de sarcoma a Yondelis® y Doxorubicina.

Línea celular	Origen del tumor	Tiempo de duplicación	YONDELIS® (nM)		Doxorubicina (nM)	
			IC50 96 h	Ensayo Clonogénico	IC50 96 h	Ensayo Clonogénico
CNIO AW	Liposarcoma	48 h	0.7	ND	45	ND
CNIO AX	Liposarcoma	48 h	0.7	0.09	44	28
SW872	Liposarcoma	24 h	0.5	0.05	>300	140
1455	Liposarcoma	48 h	0.1	0.05	>300	27
CNIO AA	Leiomiomasarcoma	36 h	0.4	0.05	21.5	12
CNIO AY	Leiomiomasarcoma	48 h	9	0.1	44	55
CNIO AZ	Tumor fibroso	96 h	5	0.06	14	37
CNIO BC	MPNST	96 h	>100	0.3	>300	109
CNIO BB	MPNST	72 h	>100	0.1	232	16
A673	Sarcoma de Ewing	24 h	1	0.1	50	52
CNIO BJ	Osteosarcoma	96 h	2	0.5	>300	30
CNIO BF	Osteosarcoma	24 h	0.3	0.07	15	14
CNIO BP	Osteosarcoma	48 h	0.3	0.2	>300	250
SAOS-2	Osteosarcoma	48 h	0.11	0.06	>300	24
CNIO BG	Fibrosarcoma	24 h	0.3	0.01	22	4
CNIO BM	Hibernoma	96 h	10	0.8	>300	>300
CNIO BN	Fibrohistiocitoma	72 h	>100	0.36	>300	>300
CNIO CE	Rabdomiosarcoma	48 h	>100	0.6	>300	>300
CNIO BI	GIST	24 h	0.1	0.09	50	25

Ensayos de citotoxicidad a 96 horas y en ensayo clonogénico para Yondelis® y Doxorubicina

En general, la sensibilidad a Yondelis® en los ensayos a 96 horas correlacionaba con aquellas líneas celulares con tiempo cortos de duplicación. Para intentar minimizar el efecto del tiempo de duplicación calculamos el IC50 en ensayos clonogénicos. Se sembraron 1000 células en pocillos de 2.5 cm y se mantuvieron en cultivo hasta que aparecieron clones individuales. Las células se trataron con las mismas concentraciones de compuesto usadas en el ensayo a 96 horas, cambiando el medio cada dos días. Las células que fueron resistentes en el ensayo a 96 horas presentaron un IC50 mayor de 0.1 nM en el ensayo clonogénico. De forma similar, las células que fueron sensibles en el ensayo a 96 horas tenían un IC50 menor de 0.1 nM en el ensayo clonogénico. A673 mostró de nuevo sensibilidad intermedia con IC50 igual a 0.1nM (**Tabla 19**). Sólo en dos de las veinte líneas no observamos correlación entre el ensayo clonogénico y el de 96 horas. La línea CNIO BP mostró mayor resistencia en el ensayo clonogénico, mientras que la línea CNIO AZ mostró sensibilidad en el ensayo clonogénico pero no en el de 96 horas. Los resultados obtenidos en la línea celular CNIO BP se podrían deber a la aparición de clones resistentes a la compuesto porque el tiempo de exposición es mayor en el ensayo clonogénico. Los resultados en la línea celular CNIO AZ pueden ser atribuibles al hecho de que la toxicidad de Yondelis® en esta línea necesite más de 96 horas para ser observado. Los valores de IC50 en la línea celular A673 (1nM en el ensayo a 96 horas y 0.1 nM en el ensayo clonogénico) fueron tomados como el punto de corte entre sensibilidad y resistencia en las líneas celulares.

Como doxorubicina se utiliza en clínica para sarcomas de tejidos blandos y osteogénicos, medimos la respuesta de las diferentes líneas celulares de sarcomas a doxorubicina. Las células se trataron con diferentes concentraciones de doxorubicina durante 96 horas como se describe en apartados anteriores y además se hizo el ensayo clonogénico como se ha descrito para Yondelis®. Las células mostraron tres respuestas bien diferenciadas al tratamiento. Aproximadamente el 50% de las líneas celulares fueron sensibles a doxorubicina, con valores IC50 similares en ambos ensayos. Un segundo grupo de líneas celulares fueron resistentes al compuesto, con IC50 mayor de 100 nM en ambos ensayos. Finalmente, un tercer grupo de líneas celulares mostraron sensibilidad sólo en el ensayo clonogénico (1455, CNIO BB, CNIO BJ y SAOS2) (Tabla). En general, la resistencia a doxorubicina no correlacionaba con la resistencia a Yondelis®.

4.4.2 EVALUACIÓN DEL ESTATUS DE P53

El estado mutacional de p53 fue analizado por Western blot y verificado por secuenciación. Analizamos el estado de p53 por secuenciación del ARNm en cada línea celular. Detectamos mutaciones en p53 en nueve de las veinte líneas celulares (**Tabla 20**), y dos de las veinte líneas muestran delección en uno o dos de los alelos del gen.

Tabla 20: Relación entre respuesta a Yondelis® y mutaciones en p53.

LINEA CELULAR	ORIGEN DEL TUMOR	RESPUESTA YONDELIS®	MUTACIONES P53
CNIO AW	Liposarcoma	S	R273H
CNIO AX	Liposarcoma	S	R273H
SW872	Liposarcoma	S	I251N
1455	Liposarcoma	S	R72P
CNIO AA	Leiomiomasarcoma	S	R273H
CNIO BF	Osteosarcoma	S	R273H
CNIO BP	Osteosarcoma	S	R72P,R175H
SAOS-2	Osteosarcoma	S	Del
CNIO BG	Fibrosarcoma	S	Del
CNIO BI	GIST	S	R273H
A673	Sarcoma de Ewing		WT
CNIO AZ	Tumor fibroso	R/S	WT
CNIO AY	Leiomiomasarcoma	R	WT
CNIO BC	MPNST	R	WT
CNIO BB	MPNST	R	WT
CNIO BJ	Osteosarcoma	R	WT
CNIO BM	Hibernoma	R	WT
CNIO BN	Fibrohistiocitoma	R	WT
CNIO CE	Rabdomiosarcoma	R	WT

Encontramos una fuerte correlación entre sensibilidad a Yondelis® y mutaciones en p53 ($p<001$) (**Figura 25**). Para confirmar estas observaciones analizamos diferentes líneas celulares isogénicas. Comparamos la línea celular HCT-116 wt y HCT-116 p53-/- (p53 delecionado por doble recombinación homóloga) y su respuesta a Yondelis®. Las células sin p53 fueron más sensibles a Yondelis® (**Figura 26**). El análisis de IC50 en tres experimentos independientes, indicaba que la ausencia de función de p53 conducía a un

incremento en la sensibilidad a Yondelis® (**Tabla 21**). Resultados similares se obtuvieron con las líneas celulares MCF7 wt y MCF7 silenciadas (shARN) para p53 en tres experimentos independientes. MCF7 wt fueron resistentes al tratamiento con Yondelis®, mientras que las MCF7 sin p53 fueron mucho más sensibles a Yondelis®.

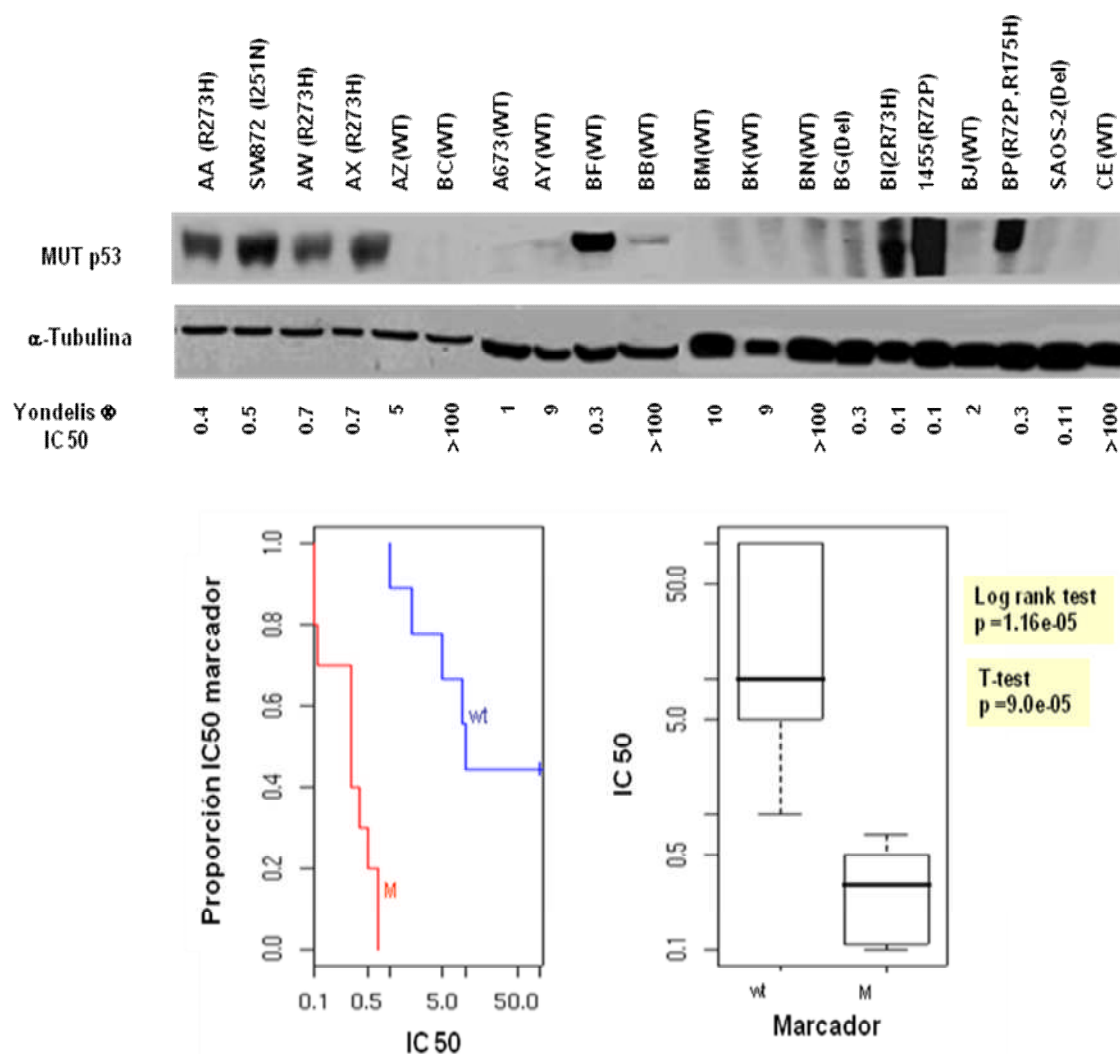


Figura 25. Relación entre p53 no funcional y Yondelis®. Gráficas de supervivencia usando la estimación de Kaplan-Meier, con el p-valor obtenido del test log-rank, y con t-test.

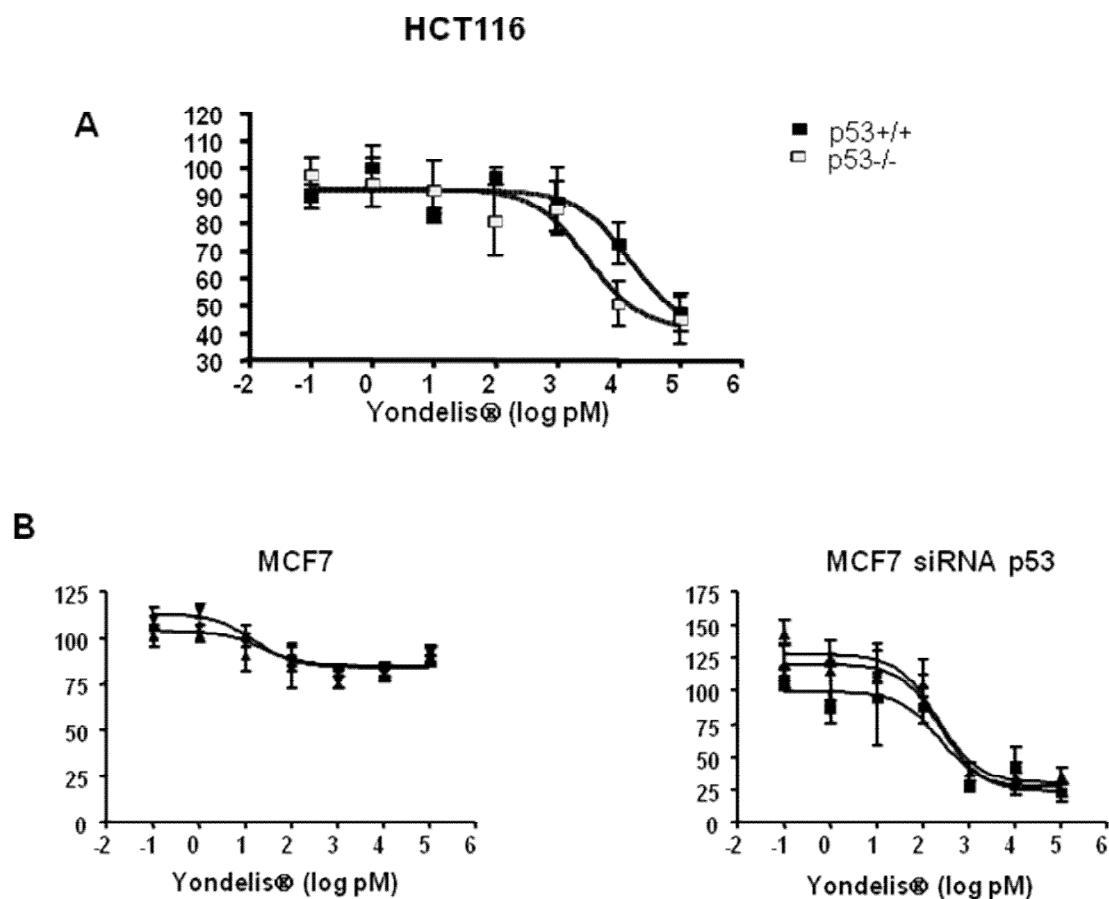


Figura 26. El efecto de Yondelis® depende de p53. (A) Líneas celulares isogénicas HCT116 (■) y HCT116 con p53 no funcional (□) (B) Líneas celulares MCF7 (izquierda) y MCF7-p53siARN. Las células fueron tratadas a diferentes concentraciones de Yondelis® durante 96 horas. Las gráficas representan el crecimiento de cada línea tratada respecto al vehículo (100%). Cada curva es la media de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

Tabla 21. IC50 de Yondelis® en HCT116 wt y HCT116 p53-/-, y MCF7 wt y MCF7 (P53siARN).

	IC50 (nM)		
HCT-116	Expto 1	Expto 2	Expto 3
P53 wt	16.63	11.30	15.89
P53 nulo	4.92	3.22	5.05
MCF7			
P53 wt	>100	>100	>100
P53 siARN	0.24	0.21	0.25

Cada experimento es la media de dos curvas realizadas por triplicado y en tres experimentos independientes. Las células se trataron con diferentes concentraciones de Yondelis® durante 96 horas. Los valores de IC50 se calcularon usando el programa Prism (GraphPad).

Para explorar si el daño producido al ADN por Yondelis® está relacionado con la resistencia derivada de p53, tratamos las células HCT-116 wt y p53^{-/-}, con Yondelis® a su concentración de IC50 durante 18h. Posteriormente medimos la respuesta a Yondelis® analizando la activación de genes que pueden contribuir a la resistencia a apoptosis (**Figura 27**). Observamos que el compuesto induce daño al ADN tal como se refleja por la acumulación de p53 en la línea celular HCT-116 wt. Sin embargo no se observa inducción de sus genes dianas p21^{CIP1} o Bax. Además, Yondelis® produce activación de la ruta de MAPK/ERK que podría actuar como una señal de supervivencia. Aún más sorprendente es la activación específica de MAPK/ERK por Yondelis® sólo en las células con p53 wt, lo que podría indicar que es una respuesta dependiente de p53.

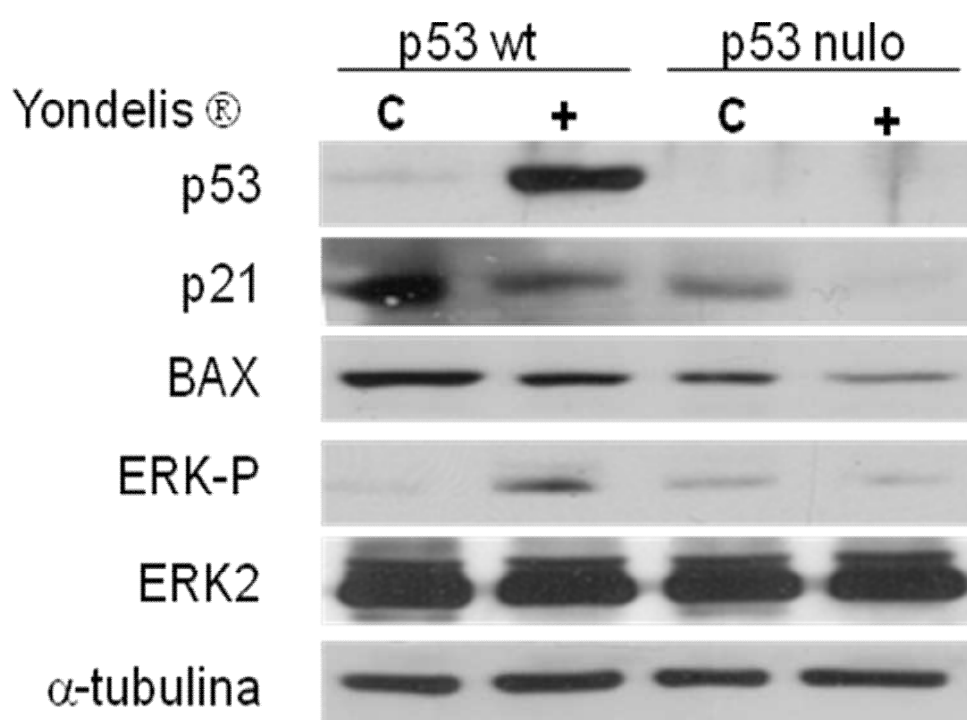


Figura 27. Efecto de Yondelis® en las líneas celulares HCT116 (P53 wt) y HCT116 (p53 nulo). Las células fueron tratadas a su concentración de IC50 durante 18 horas, posteriormente se obtuvieron los lisados celulares y la proteína fue cuantificada por Western Blot como se describe en el apartado de materiales y métodos.

4.5 LOS NIVELES DE P27^{KIP1} DETERMINAN LA SENSIBILIDAD A APLIDINA®

4.5.1 RESPUESTA A APLIDINA® DE LAS LÍNEAS DE SARCOMA

Todas las líneas celulares de sarcoma fueron tratadas en las mismas condiciones con Aplidina® y se calculó su IC50 como la media de tres experimentos independientes por triplicado (**Tabla 22**). La respuesta a Aplidina® variaba entre menos de 1 nM, en líneas celulares como CNIO BG, 1455 y CNIO AA, y más de 30 nM, en las líneas CNIO BC y SW872. Se encontraron diferencias de hasta 100 veces entre las líneas más sensibles y las más resistentes. La respuesta era independiente del tipo de tumor.

Tabla 22: Sensibilidad a Aplidina® en el panel de líneas de sarcoma a bajo pase.

Línea celular	Origen del tumor	Aplidina® (nM)
CNIO BC	MPNST	35.65±6.11
SW872	Liposarcoma	33.14±3.08
CNIO BJ	Osteosarcoma	17.21±4.2
A673	Sarcoma de Ewing	17.09±5.69
CNIO BM	Hibernoma	12.67±5.33
CNIO BB	MPNST	8.22±2.28
CNIO BP	Osteosarcoma	7.86±3.61
CNIO BN	Fibrohistiocitoma	6.44±2.73
CNIO AY	Leiomioma	3.85±0.37
CNIO AZ	Tumor fibroso	2.83±0.73
CNIO AW	Liposarcoma	2.33±0.66
CNIO AX	Liposarcoma	2.25±1.53
SAOS-2	Osteosarcoma	1.93±0.75
CNIO BF	Osteosarcoma	1.59±0.09
CNIO CE	Rabdomiosarcoma	1.21±0.6
CNIO BI	GIST	1.0±0.44
CNIO BG	Fibrosarcoma	0.92±0.21
1455	Liposarcoma	0.89±0.5
CNIO AA	Leiomioma	0.27±10.08

El análisis mostró cierta correlación entre sensibilidad a Aplidina® y niveles bajos de p27^{KIP1}. Para estudiar este efecto en profundidad, los niveles de proteína p27^{KIP1} fueron analizados por Western blot con células en proliferación activa y en las mismas condiciones para las veinte líneas. Las células fueron sembradas al 40% de saturación y crecidas hasta que alcanzaron el 80% de confluencia. Se recogieron los lisados y se determinó la cantidad de proteína. Los experimentos fueron repetidos tres veces de forma independiente con similares resultados. Los niveles de p27^{KIP1} fueron cuantificados por densitometría y normalizados con los niveles de α -tubulina en la misma membrana. Posteriormente comparamos los niveles de p27^{KIP1} con la sensibilidad a Aplidina®. Encontramos que había una alta correlación entre el IC50 de Aplidina® y los niveles relativos de p27^{KIP1}. El test de correlación de Spearman's muestra un p valor de 6.835e-05 entre el IC50 de Aplidina® y los niveles de p27^{KIP1}.

Con objeto de realizar un estudio funcional, se estratificó la cantidad de p27^{KIP1} en tres niveles: bajo cuando la relación de p27^{KIP1}/ α -tubulina es inferior a 0.5; medio, cuando varía desde 0.5 a 1.5; y alto, cuando es mayor de 1.5. Los diferentes niveles de expresión de la proteína p27^{KIP1} fueron correlacionados con la sensibilidad a Aplidina® en el panel de líneas de sarcoma (**Figura 28**).

Las líneas celulares con altos niveles de p27^{KIP1} (SW872, CNIO BC, A673 Y CNIO BP) mostraron altos valores de IC50. Las líneas celulares con moderados niveles de p27^{KIP1} (CNIO AX, CNIO AZ, CNIO BB, CNIO BM, CNIO BN, CNIO BI, CNIO BJ, SAOS-2 y CNIO CE) mostraron valores intermedios de IC50 con una diferencia estadística significativa cuando se compara con las células con altos niveles de p27^{KIP1} (p=0.0031). Las células con bajos niveles de p27^{KIP1} (CNIO AA, CNIO AW, CNIO AY, CNIO BF, CNIO BG y 1455) presentaron alta sensibilidad a Aplidina® (p=0.0072 cuando se compara con células con altos niveles de p27^{KIP1}; p=0.13 cuando se compara con células con niveles medios de p27^{KIP1}). En resumen, las líneas celulares con altos niveles de p27^{KIP1} eran más resistentes al tratamiento con Aplidina®, mientras que las líneas celulares con bajos niveles de p27^{KIP1} eran más sensibles a Aplidina®.

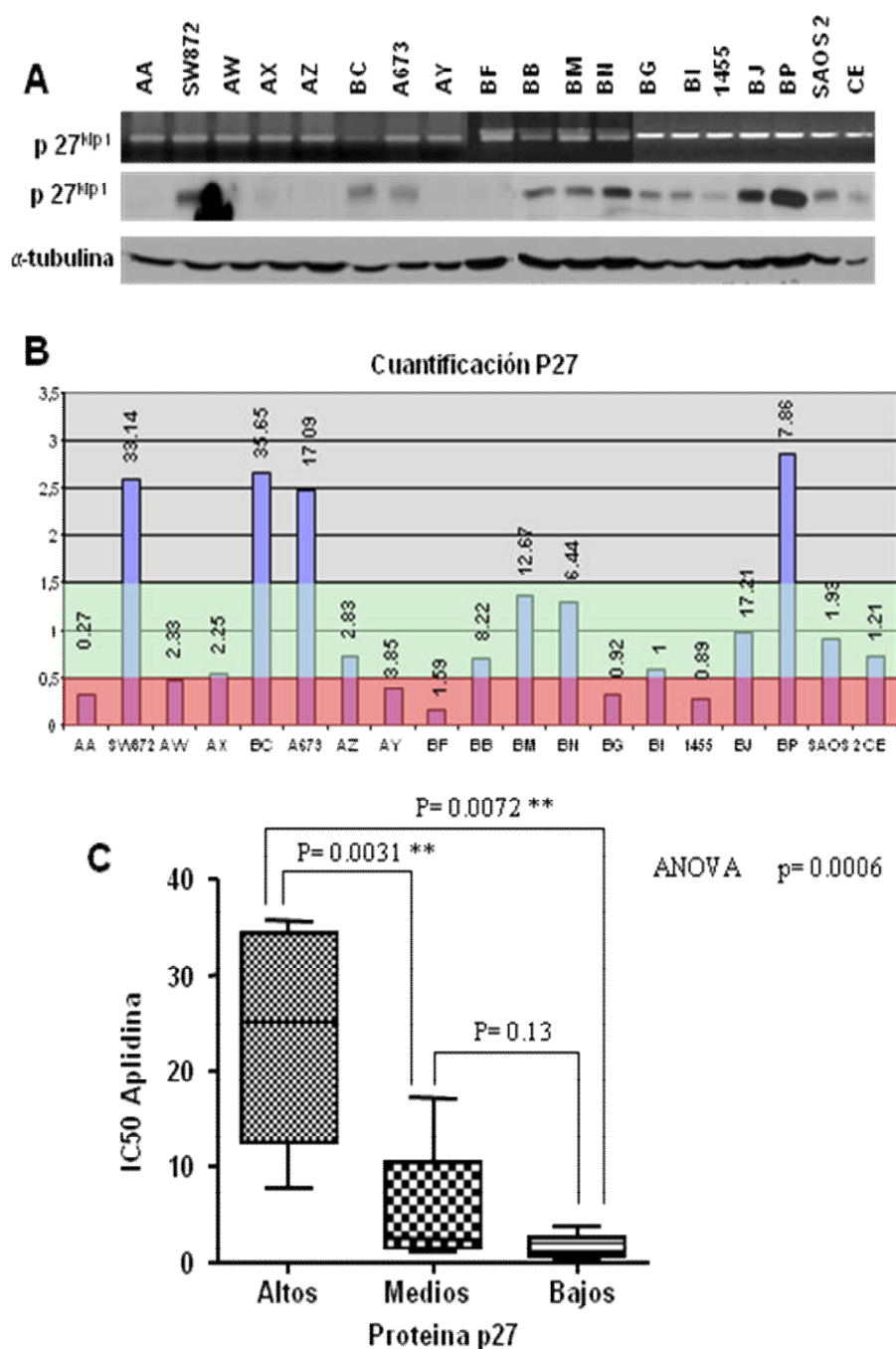


Figura 28. Correlación entre niveles de p27^{KIP1} y Aplidina®. (A) Expresión de p27^{KIP1} en el panel de líneas de sarcoma. La presencia de ARNm en todas las líneas fue analizado por RT-PCR (figura superior), niveles de proteína p27^{KIP1} (figura central), y Western Blot de los niveles de α-tubulina (figura inferior) se muestran como control de carga. (B) Los niveles de expresión de la proteína p27^{KIP1} fueron calculados por densitometría y normalizados con α-tubulina (el IC50 para Aplidina® es mostrado en cada columna). (C) Correlación entre IC50 de Aplidina® y expresión de p27^{KIP1}. Las líneas celulares se agruparon de acuerdo a sus niveles relativos de p27^{KIP1} y se determinó su correlación con el IC50. Posteriormente, se verificó el significado estadístico con ANOVA, y los tres t-test comparan las medias de los tres grupos de p27^{KIP1}, altos, medios y bajos.

4.5.2 LA AUSENCIA DE $p27^{KIP1}$ INCREMENTA LA SENSIBILIDAD A APLIDINA® EN FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS MURINOS.

Para validar la relevancia de $p27^{KIP1}$ en la respuesta a Aplidina® decidimos utilizar fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) procedentes de ratones deficientes para $p27^{KIP1}$. Los MEFs fueron tratados con Aplidina® y su sensibilidad fue comparada con MEFs wt del mismo fondo genético. Observamos que se mantenía la correlación entre niveles de $p27^{KIP1}$ y sensibilidad a Aplidina® encontrada en el panel de las líneas de sarcoma. Los MEFs $p27^{-/-}$ fueron más sensibles a Aplidina® comparados con los MEFs wt isogénicos. Cuando los MEFs wt y $p27^{-/-}$ fueron tratados con otros compuestos tales como vinblastina, flavopiridol o doxorubicina, las células $p27^{-/-}$ fueron igual o incluso menos sensibles a algunos de los tratamientos antitumorales que las correspondientes células con $p27^{KIP1}$ (**Tabla 23**).

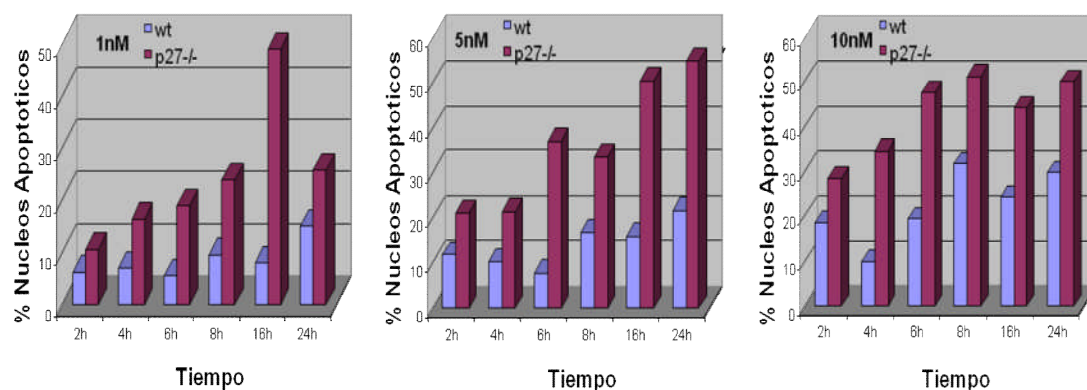
Tabla 23: Sensibilidad de MEFs wt, $p27^{-/-}$ y $p21^{-/-}$, a Aplidina®, vinblastina, flavopiridol y doxorubicina.

Compuesto	WT (IC50 nM)	P27 ^{-/-} (IC50 nM)	P21 ^{-/-} (IC50 nM)
Aplidina®	2.9	0.5	91.65
Vinblastina	7.8	14	>100
Flavopiridol	1.1×10^3	$>100 \times 10^3$	0.32×10^3
Doxorubicina	105	65	45

Es posible que el efecto de Aplidina® sea debido a la ausencia de inhibición del ciclo celular y esto hacer que las células $p27^{-/-}$ fueran más sensibles al tratamiento. Para estudiar si esto ocurría, células $p21^{-/-}$ procedentes de ratones knockout para esta proteína fueron tratadas con Aplidina® en las mismas condiciones que las $p27^{-/-}$. En este caso, las células $p21^{-/-}$ fueron menos sensibles a Aplidina® que las células wt (**Tabla 23**).

Posteriormente analizamos la inducción de apoptosis por Aplidina® en células $p27^{-/-}$. El tratamiento de MEFs $p27^{-/-}$ con diferentes concentraciones de Aplidina® (1, 5, ó 10 nM) inducía apoptosis medida como el número de núcleos apoptóticos o por aumento en señal de Anexina V (**Figura 29**).

A



B

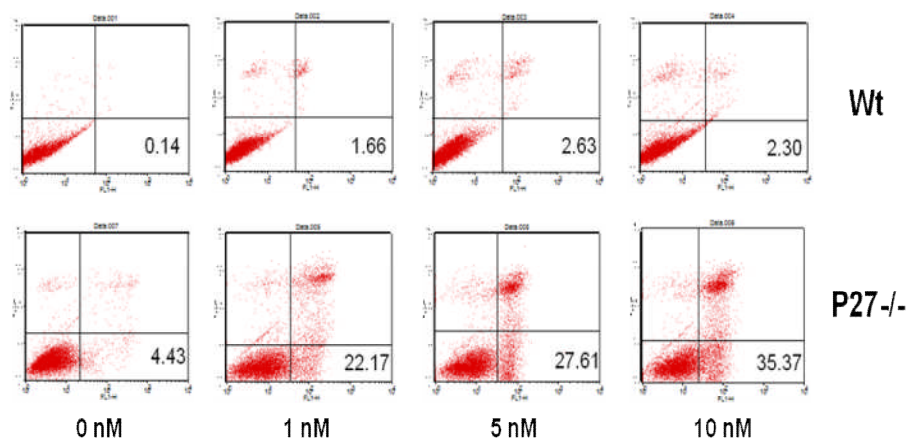


Figura 29. Incremento de nucleos apoptóticos (A) y marcaje con Anexina V (B) en MEFs p27^{-/-} y wt tratados con diferentes concentraciones de Aplidina®. Los números dentro de las gráficas muestran el porcentaje de células positivas para Anexina V en cada caso. Para más información ver el texto.

El efecto de Aplidina® en el ciclo celular fue evaluado mediante citometría de flujo midiendo el contenido de ADN. No se observó ni parada de ciclo, ni una subpoblación en sub-G1 en MEFs wt después de un tratamiento de 24 horas con diferentes concentraciones de Aplidina®. Sin embargo, en las células p27^{-/-} se observó una clara parada en G2 con inducción de una subpoblación sub-G1, que incrementaba a medida que aumentaba las concentraciones de Aplidina®. Los resultados confirmaron la mayor sensibilidad de las células p27^{-/-} al tratamiento con Aplidina® así como la inducción de apoptosis con parada en G2-M (**Figura 30**).

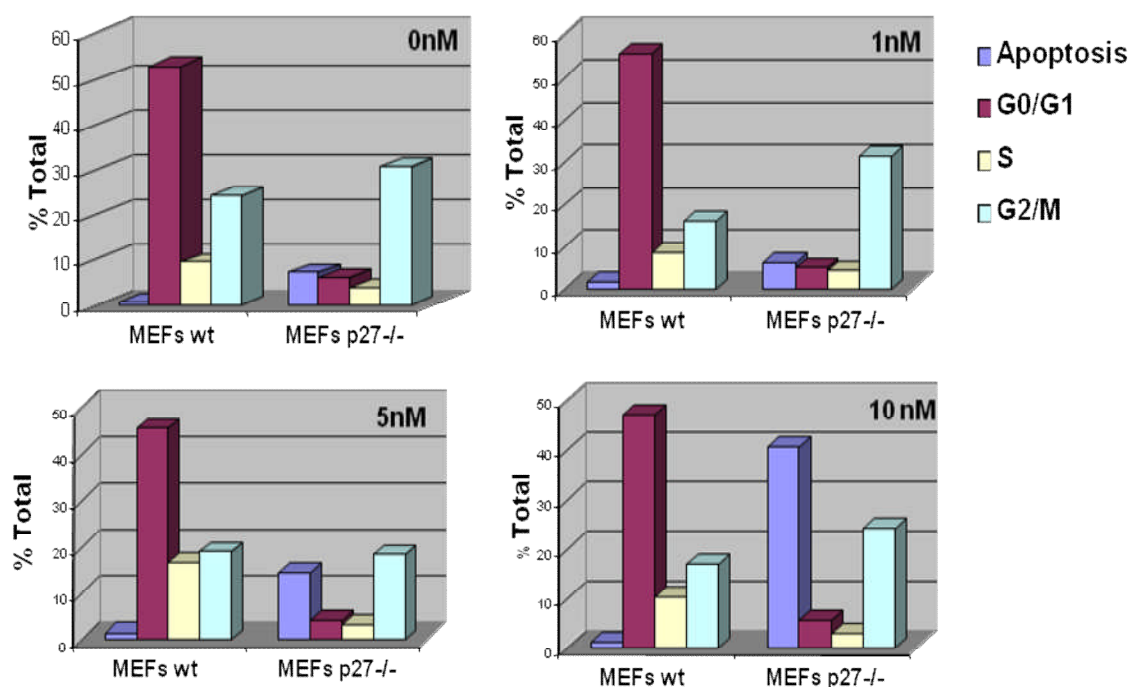


Figura 30. Análisis del ciclo celular en MEFs wt y p27^{-/-} con diferentes concentraciones de Aplidina®.

4.5.3 RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE LOS NIVELES DE P27^{KIP1} Y RESPUESTA A APLIDINA®.

Para evaluar la correlación entre sensibilidad a Aplidina® y niveles de p27^{KIP1} se analizó la respuesta a aplidina® en diferentes líneas celulares humanas donde eliminamos p27^{KIP1} mediante shARN. Tres shARN diferentes contra p27^{KIP1} fueron seleccionados y se analizó su capacidad para reducir los niveles de proteína p27^{KIP1}. Se seleccionaron tres líneas celulares cada una de ellas representativa de los diferentes niveles de p27^{KIP1} mostrados anteriormente, A673 con niveles altos, CNIO AW con niveles intermedios y CNIO AA con niveles bajos de proteína p27^{KIP1}. Se generaron las líneas que expresaban el vector vacío y las que expresaban constitutivamente los diferentes shARN. Uno de los shARN seleccionados (Hs960) redujo los niveles de proteína en un 80%-90% (**Figura 31**). Además, hicimos una validación funcional. La sobreexpresión p27^{KIP1} en las células CNIO AA (con bajos niveles de p27^{KIP1}) causa parada del crecimiento, mientras que la expresión del shARN para p27^{KIP1} supera esa parada (**Figura 31B**), confirmando la validación funcional del shARN. La transfección del shARN no produce un efecto apreciable en el crecimiento de ninguna de las líneas celulares (dato no mostrado).

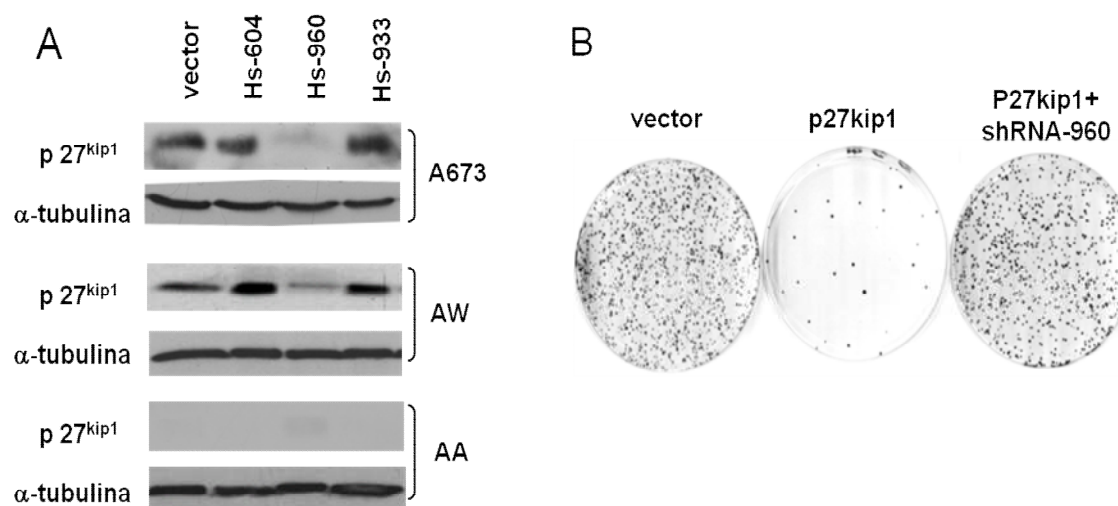


Figura 31. (A) Niveles de proteína p27^{KIP1} en células A673, AW y AA que expresan diferentes shARNs contra p27^{KIP1}. (B) Validación funcional de Hs960 shARN contra p27^{KIP1}. Las células AA fueron transfectadas con el vector vacío o con el vector que contenía el cADN total de p27^{KIP1} o cotransfectadas con el vector con p27^{KIP1} más shARN contra p27^{KIP1}. Las células fueron seleccionadas, y después de 10 días, las colonias se fijaron y tiñeron.

Se estudió la sensibilidad a Aplidina® de las células seleccionadas por su expresión de shARN y las células parentales con el vector vacío (**Figura 32**). La reducción de los niveles de p27^{KIP1} hizo a las células A673 más sensibles a Aplidina®. En la línea celular CNIO AW se observó una reducción moderada de la sensibilidad con el shARN. Sin embargo, las células CNIO AA, con bajos niveles de p27^{KIP1}, no fueron más sensibles por el shARN.

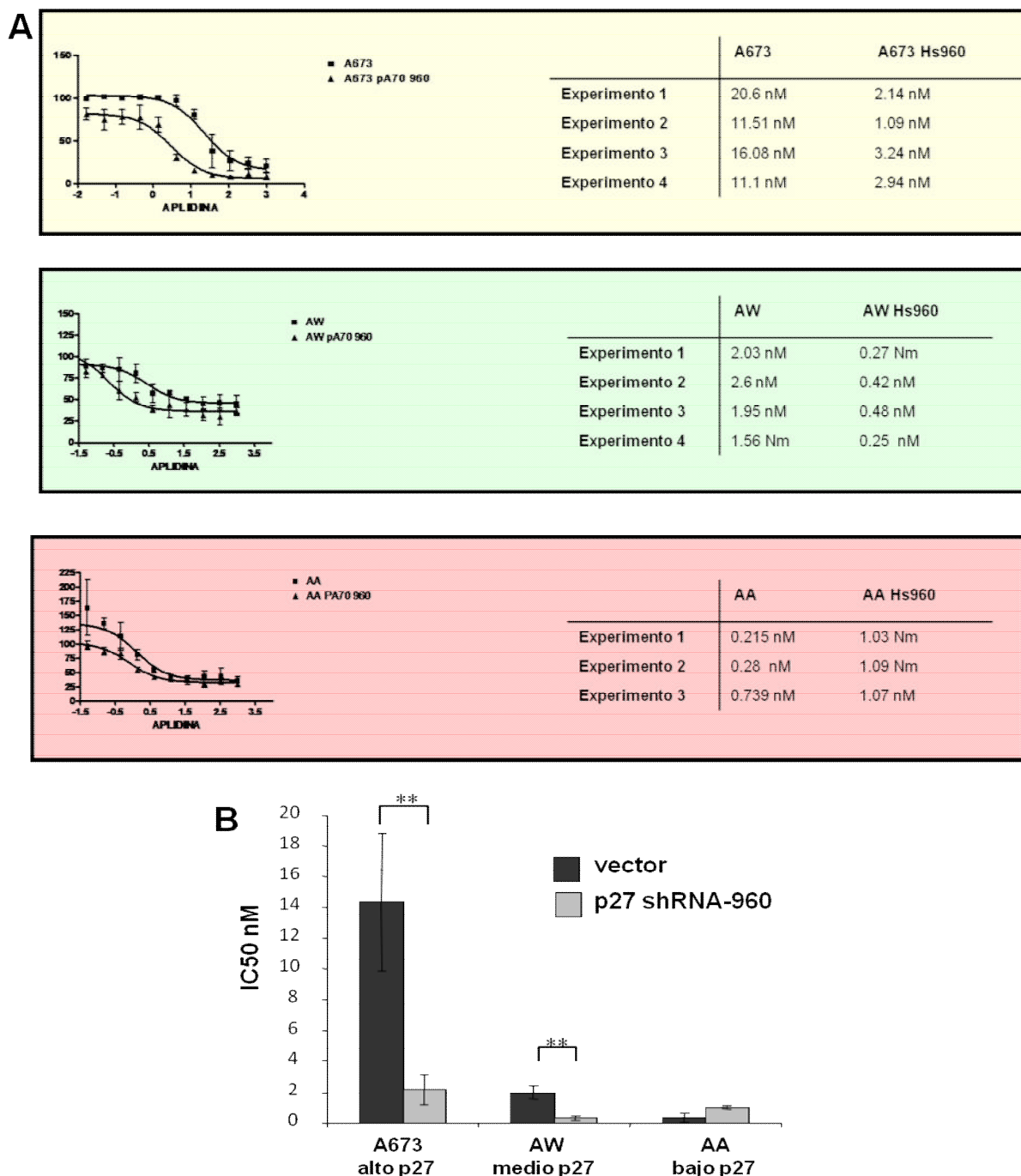


Figura 32. Reducción de los niveles de $p27^{KIP1}$ aumenta la sensibilidad a Aplidina®. (A) La sensibilidad a Aplidina® de las diferentes líneas de sarcoma transfectadas con shARN contra $p27^{KIP1}$ comparadas con su parental. (B) Las columnas representan la media de cuatro experimentos independientes en las células A673 y AW y tres en AA. Utilizamos t-test (Welch's test). A673 t:5.57 (p=0.00954); AW t:7.57 (p=0.0030); y AA t:-3.93 (p=0.057). Para A673 y AW, hay una fuerte evidencia estadística de que las células parentales son menos sensibles.

Aplidina® tiene un efecto antiproliferativo dependiente de los niveles de $p27^{KIP1}$. Para continuar el estudio examinamos si Aplidina® afectaba los niveles de expresión de $p27^{KIP1}$. Pudimos observar que Aplidina® induce desregulación de $p27^{KIP1}$ (**Figuras 33**).

Esta inducción de p27^{KIP1} parece estar mediada como respuesta a estrés oxidativo por el tratamiento, ya que si tratábamos las células con antioxidantes, tales como 10mmol/L de glutatión reducido, se inhibía la inducción de p27^{KIP1} mediada por Aplidina®.

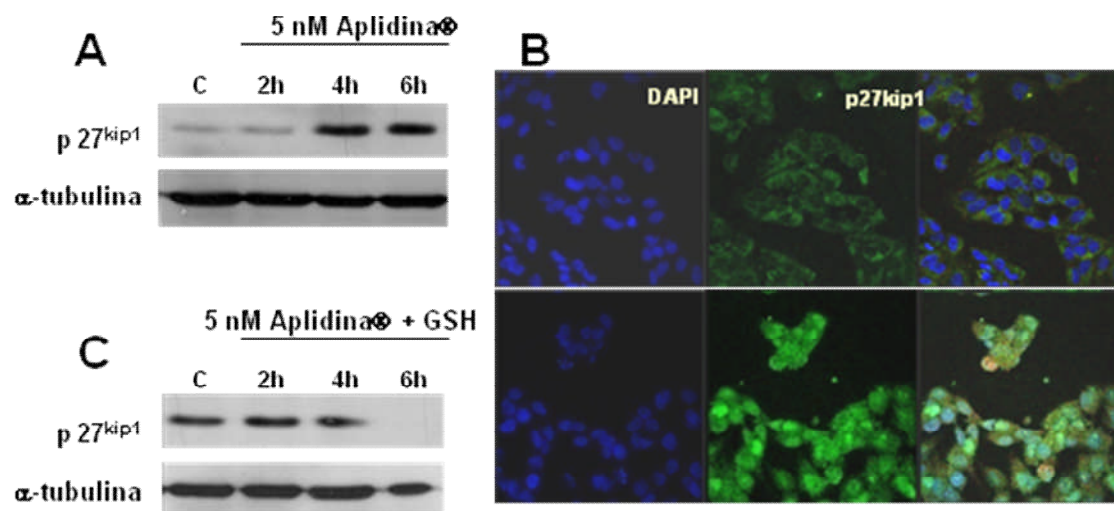


Figura 33. Aplidina induce p27^{KIP1} dependiente de oxidación. (A) Aplidina® induce p27^{KIP1} en la línea celular A673. Inmunodetección por Western Blot. (B) Aplidina® induce p27^{KIP1}. Inmunodetección por fluorescencia, las condiciones fueron idénticas a A. (C) La inducción de p27^{KIP1} por Aplidina®, se inhibe por tratamientos con antioxidantes (10 mmol/L de glutatión reducido (GSH)). El tratamiento con GSH se realizó 10 minutos antes que el tratamiento con Aplidina®.

5 DISCUSIÓN

Durante los últimos 30 años la oncología se ha centrado en los resultados de los diferentes tratamientos en pacientes, desarrollando nuevos agentes antitumorales y definiendo nuevos factores pronóstico. Sin embargo, las estrategias clínicas actuales benefician a un pequeño grupo de pacientes. Es necesario exponer a tratamientos antitumorales a un gran número de pacientes para obtener beneficios en una pequeña fracción de ellos.

Los estudios farmacogenómicos actuales tienen como objetivo identificar biomarcadores predictivos que ayuden a identificar grupos de pacientes que puedan beneficiarse de una terapia. Estos marcadores moleculares de respuesta a fármacos no tienen que ser exclusivos de las llamadas “terapias diana”. Ejemplos representativos de estos biomarcadores son: la relación entre la expresión del ARNm de timidilato sintasa (TS) y respuesta a antifolatos (Popat et al., 2004), los niveles de ARNm de β -tubulina III y respuesta a agentes que interaccionan con tubulina (Seve et al., 2005), la metilación de PTEN y resistencia a CPT-II (Longley and Johnston, 2005) o sobreexpresión de STAT3 y resistencia a moduladores de EGFR.

Uno de los objetivos de nuestro trabajo consistía en desarrollar herramientas celulares que nos permitieran realizar estudios farmacogenómicos *in vitro* con cierta capacidad predictiva en clínica. Para ello, hemos desarrollado un panel de líneas celulares tumorales procedentes de biopsias de pacientes. En ellas hemos realizado un estudio comparativo de los perfiles de expresión (tanto a nivel de ARNm como de proteína) de diferentes genes comúnmente alterados en cáncer y su respuesta a diferentes fármacos utilizados actualmente en clínica. Con la ayuda de herramientas bioinformáticas se han generado matrices de datos que nos permitirán analizar posibles mecanismos de acción de estos fármacos, identificando factores que puedan predecir la respuesta de las células a las diferentes terapias.

5.1 PANEL DE LÍNEAS CELULARES MÍNIMAMENTE PASADAS

Una de las principales ventajas de este trabajo reside en que permite realizar estudios de sensibilidad y resistencia a fármacos en líneas celulares con pocos pases. En la actualidad, estos estudios se realizan con líneas celulares establecidas hace tiempo y que, presumiblemente, han acumulado muchos cambios producidos por la presión del cultivo durante gran número de pases de forma que su semejanza genética con el tumor original es pequeña.

Las células cancerígenas son inmortales, característica que las diferencia de las células somáticas normales que tienen una capacidad replicativa limitada (Hanahan and Weinberg, 2000). Gracias a esta diferencia, cuando realizamos cultivos primarios de células procedentes de un tejido tumoral esperamos que se produzca una selección de las células cancerígenas que son inmortales frente a las que no lo son. Según lo descrito en la literatura, para que una célula se convierta en inmortal tiene que superar dos barreras

denominadas senescencia y crisis (Campisi, 1997; Faragher et al., 1998; Vojta and Barrett, 1995). En nuestros cultivos al principio observamos una gran heterogeneidad y, según progresan, podemos observar una disminución en su potencial de crecimiento relacionado con la aparición de células grandes aplanadas y con un alto número de células senescentes. Esto refleja la heterogeneidad inicial de los cultivos primarios ya que las muestras iniciales están compuestas por los diferentes tipos celulares presentes en la muestra tumoral. Sin embargo, la evasión del proceso de senescencia celular no significa inmortalización.

En modelos celulares humanos las células sufren un segundo bloqueo caracterizado por anomalías cromosómicas y un elevado índice de muerte celular. Este segundo bloqueo es conocido como crisis y es dependiente de la erosión telomérica y de la consiguiente desprotección de los cromosomas (Collado et al., 2007; Finkel et al., 2007). Este proceso se corresponde con el segundo bloqueo que observamos en nuestros cultivos y que se caracteriza por una muerte celular abundante. Como hemos visto en el apartado de resultados, no todos los cultivos tienen el mismo comportamiento respecto al proceso de crisis. Algunos no superan la crisis y no progresan y otros no la sufren. Es probable que estas diferencias tengan relación con la abundancia de células transformadas que haya inicialmente en nuestros cultivos, lo cual, a su vez, podría estar relacionado con la localización o el grado de agresividad del tumor original. El proceso de crisis observado *in vitro* puede ser debido a la muerte de subpoblaciones tumorales que aún no han activado telomerasa o ALT y la pérdida de la subpoblación no transformada. Estos resultados encajan bien con los requerimientos de activación de hTERT en líneas no tumorales de mama para conseguir su inmortalización. También es posible, siguiendo la teoría de las células madre del cancer, que la población seleccione sólo aquellas células madre para iniciar el cultivo inmortal, perdiéndose aquellas células tumorales sin capacidad de autoregeneración.

En este trabajo hemos intentado inmortalizar células epiteliales de mama y ovario procedentes de mujeres portadoras de mutaciones en BRCA, que sirvan de herramienta para estudiar el proceso tumorigénico y para incluirlas en nuestro panel con objeto de buscar tratamientos preventivos. Hemos desarrollado un tratamiento moderado y gradual para inmortalizarlas introduciendo el menor número de alteraciones genéticas. La expresión ectópica de la telomerasa ha ayudado a la inmortalización de cultivos primarios de piel, esófago, córnea y pulmón (Morales et al., 2003; Ramirez et al., 2003; Ramirez et al., 2004; Robertson et al., 2005). La muestra de mama normal se inmortalizó con hTERT perdiéndose el cultivo que no expresa el vector. De esta forma se obtuvo una línea celular de mama normal sin utilizar oncogenes virales. La muestra que procedía de una ligera ectasia ductal se inmortalizó espontáneamente independientemente de la expresión de hTERT. Es posible que en esta paciente el proceso de transformación estuviera en sus primeras etapas y una pequeña población de células hubiera adquirido ya la capacidad de crecimiento ilimitado probablemente por activación espontánea de la telomerasa. Por otra

parte, del carcinoma ductal infiltrante se immortalizaron las dos líneas iniciales, tal y como se esperaba. Estas líneas celulares contribuirán en la identificación de patrones de sensibilidad y resistencia a diferentes fármacos en las etapas de transformación maligna.

En paralelo se intentaron immortalizar varias muestras de ovario siguiendo la misma metodología. Como se describe en el apartado de resultados, las células no se immortalizaron, probablemente porque estas células necesitaran de alguna otra alteración genética adicional aparte de la expresión de la telomerasa. Yang y colaboradores (Yang et al., 2007) consiguieron immortalizar células epiteliales de ovario de la superficie mediante silenciamiento de p53 y activación de hTERT.

En nuestro trabajo pretendíamos poner a punto una metodología que permitiera establecer líneas celulares de diferentes orígenes. Uno de los mayores problemas de los cultivos primarios es la contaminación por la presencia de fibroblastos que crecen rápidamente compitiendo con las células tumorales. Aunque la clonación y el uso de medios selectivos suelen ser los mejores métodos para purificar un cultivo, sin embargo en ocasiones cuando la clonación tiene una baja eficiencia o cuando las condiciones de selección no son apropiadas hay que buscar técnicas alternativas. Entre las técnicas disponibles para purificar células, nosotros nos decantamos por técnicas de inmunoafinidad utilizando anticuerpos que reconocen epitopos específicos en la superficie celular. Los pioneros en la separación de diferentes tipos celulares con esta técnica fueron Wysocky y Sata en 1978, quienes desarrollaron técnicas para separar diferentes poblaciones de linfocitos. Los marcadores que seleccionamos para la detección y separación de fibroblastos fueron: BerEP4, CD54, Vimentina, citoqueratinas, GFAP, S-100, E-cadherina, N-cadherina y V-CAM. Tras estudiar su expresión en varias líneas celulares (ver apartado de resultados), pudimos comprobar que la manera más eficiente para separar fibroblastos de células epiteliales era un marcaje positivo para BerEP4.

5.2 IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE RESPUESTA A FÁRMACOS ANTITUMORALES

Varios laboratorios han demostrado la importancia de utilizar biomarcadores para seleccionar los pacientes que pueden responder a una terapia, tanto con compuestos que actúan contra una diana determinada como para agentes sin diana definida (Balko et al., 2006; Bild et al., 2006; Chen et al., 2006; Dressman et al., 2006a; Dressman et al., 2006b; Potti et al., 2006). El objetivo es predecir los pacientes que podrían beneficiarse de una terapia concreta, evitando de esta manera toxicidades innecesarias. Un caso claro de la importancia de estos estudios son los realizados recientemente en pacientes con cáncer de colon que no respondían a terapias con inhibidores de EGFR en los que se ha identificado que cuando *Kras* está mutado la respuesta es peor (Baynes and Gansert, 2009).

Nuestro grupo ha desarrollado un sistema que nos permite relacionar alteraciones moleculares con respuestas *in vitro*. En primer lugar, lo que hicimos fue validar nuestro sistema. Para ello estudiamos la relación que encontrábamos en compuestos con diferentes mecanismos de acción. El sistema fue validado con las diferentes relaciones descritas como la de flavopiridol con CDK4 (Lu et al., 2000), sensibilidad a taxol en células con p53 no funcional (Kielb et al., 2001; Kurschat and Mauch, 2000), resistencia a taxol relacionado con altos niveles de PDGFR (Isonishi et al., 2007) y p53 mutado, la relación entre LY291002 y PTEN, así como la fosforilación de p60Src y resistencia a oxaliplatino (Griffiths et al., 2004).

Aplicando el mismo programa a compuestos marinos proporcionados por la empresa farmacéutica PharmaMar, pudimos observar una importante relación entre ausencia de función de p53 y sensibilidad a Yondelis®. Con Aplidina®, observamos correlación entre niveles altos de p27^{KIP1} y resistencia al compuesto. Por último, hallamos relación entre sensibilidad a Zolypsis® y bajos niveles del receptor PDGFR- α tanto *in vitro* como *in vivo*.

El trabajo realizado nos ha permitido correlacionar la sobreexpresión de PDGFR- α con la resistencia a Zolypsis® *in vivo*. La sobreexpresión de PDGFR- α puede conducir a una activación constitutiva de la vía de señalización de supervivencia a través de la activación de MEK o AKT (Gu et al., 1998; Johnson et al., 2002; Kang et al., 2005; Pratsinis and Kletsas, 2007; Taylor, 2000). Según hemos podido comprobar (datos no mostrados), la activación constitutiva de EGFR también contribuye a la resistencia a Zolypsis® *in vivo* y, por lo tanto, la combinación de Zolypsis® con inhibidores de tirosina quinasas sería una opción muy interesante en estos casos. Además, como la activación constitutiva de c-Kit también parece contribuir a esta resistencia, Zolypsis®+glivec podría ser otra combinación a tener en cuenta. Sin embargo, harían falta más experimentos para confirmar esta hipótesis.

5.3 YONDELIS® Y P53

Yondelis® es un nuevo agente antineoplásico aislado originalmente del tunicado marino *Ecteinascida turbinata* y que en la actualidad se produce de forma sintética. La actividad citotóxica de Yondelis® *in vitro* está en el rango nanomolar bajo y es dosis dependiente (Herrero et al., 2006; Li et al., 2001; Scotlandi et al., 2002). Yondelis® ha demostrado actividad *in vitro* e *in vivo* en varias líneas celulares de tumores sólidos incluyendo sarcoma de tejidos blandos, ovario, mama, próstata, carcinoma renal, melanoma y NSCLC. En estudios preclínicos las líneas celulares de sarcoma fueron considerablemente más sensibles a Yondelis® que a otros agentes como doxorubicina, metotresato, etoposido o paclitaxel. Además las líneas de sarcoma fueron mucho más sensibles a Yondelis® que las líneas celulares de carcinomas de colon o mama (Li et al., 2001).

En el panel de líneas celulares de sarcoma con bajo pase desarrollado en este trabajo, se estudió la respuesta a Yondelis® y doxorubicina. En general, los patrones de sensibilidad y resistencia fueron similares en los ensayos clonogénicos y en los ensayos de dosis-respuesta de 96 horas. La respuesta a Yondelis® no correlacionaba con la respuesta a doxorubicina, indicando que ambos fármacos tienen mecanismo de resistencia diferente. Estos resultados son similares a los publicados por otros autores (Izbicka et al., 1998; Li et al., 2001; Takahashi et al., 2001), en los que observaban que no existía relación entre la respuesta a Yondelis® y a doxorubicina. Por otro lado, se han observado pacientes que no han respondido a la terapia con doxorubicina y sí al tratamiento con Yondelis® (Le Cesne et al., 2005).

Al estudiar la relación entre la respuesta de las diferentes líneas celulares a Yondelis® y los diferentes marcadores, observamos que existía una correlación muy significativa entre alteración de p53 y sensibilidad a Yondelis® ($p < 0.01$). La inactivación de p53 por mutación es una de las alteraciones moleculares más frecuentes en sarcoma de tejido blando ya que ocurre entre 30%-50% de los tumores (Toguchida et al., 1992). Por otro lado, la sobreexpresión de p53 evaluada por inmunohistoquímica es más frecuente en tumores de alto grado o metastáticos que en los de bajo grado o tumores primarios (Cordon-Cardo et al., 1994; Drobnjak et al., 1994; Latres et al., 1994). Además, los pacientes con sarcoma que presentan p53 mutado muestran mayor índice de resistencia a distintos tratamientos, peor pronóstico y menos supervivencia que los que tienen p53 normal (Drobnjak et al., 1994). Se ha descrito recientemente que la sobreexpresión de Bcl-2 y la mutación de p53 están involucrados en la resistencia a fármacos en sarcomas (Fayette and Blay, 2005).

El análisis funcional en ensayos de dosis-respuesta a 96 horas en líneas isogénicas, mostró que la ausencia de p53 incrementaba la sensibilidad a Yondelis®. Erba y colaboradores (Erba et al., 2001) estudiaron la respuesta a Yondelis® en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) con o sin p53 (p53 +/+, p53 -/-), y en las líneas celulares procedente de un carcinoma de ovario A2780 y A2780CX3 con la mutación val143ala en p53. No observaron diferencias estadísticamente significativas en la respuesta a Yondelis® en estas líneas celulares con diferente estatus de p53, en ensayos de citotoxicidad realizados a 24 o 48 horas. Sin embargo, en ensayo clonogénico en las líneas celulares humanas de colon SW620 que no expresan p53, Erba y colaboradores observaron que eran más sensibles a Yondelis® que las células LoVo que son normales para p53. Una posible explicación para esta discrepancia de resultados podría ser que la respuesta a Yondelis® se observa en los ensayos de citotoxicidad a tiempos largos (72, 96 hrs o en ensayo clonogénico) y no a tiempos cortos (a 24 o 48 horas). En nuestros ensayos pudimos observar que la respuesta diferencial entre ambas líneas celulares era clara en ensayos clonogénicos y a partir de 72 horas de incubación con el compuesto.

Se ha descrito que Yondelis®, a concentraciones farmacológicas, se une al surco menor del ADN, preferiblemente a tripletes ricos en GC, interaccionando covalentemente con el

N₂ terminal de la guanina (Pommier et al., 1996). Como consecuencia de la unión el surco menor se abre y distorsiona la doble hélice hacia el surco mayor (Zewail-Foote and Hurley, 1999). Los aductos formados por Yondelis® activan los mecanismos de reparación del ADN. Estas lesiones son reconocidas por la maquinaria de reparación por escisión de nucleótidos (NER) (Erba et al., 2001; Takebayashi et al., 2001; Zewail-Foote and Hurley, 1999). Se ha demostrado que células de mamífero deficientes en proteínas implicadas en NER como las helicasas XPD y XPB, y endonucleasas XPG y ERCC1 muestran entre 2-8 veces más resistencia a Yondelis® que las correspondientes células con NER funcional. Sin embargo, la alta actividad residual del compuesto en células deficientes en NER, sugiere que éste no puede ser el único mecanismo de acción de Yondelis®. Soares y colaboradores en 2007 (Soares et al., 2007) observaron que los aductos producidos por Yondelis® son pobremente reparados y son capaces de inducir daños secundarios en el ADN. Los aductos no reparados conducen a la formación de roturas en la doble cadena como demostraron por la inducción de foci de histona γ -H2AX. La formación de lesiones secundarias en el ADN no es exclusivo para Yondelis®, previamente se había descrito para otros agentes como Mitomicina C (Niedernhofer et al., 2004) o S23906 (Leonce et al., 2006). Por otro lado, las células de mamífero deficientes en HR presentan una gran sensibilidad a Yondelis® (8-23 veces), mientras que las células deficientes en NHEJ no presentan diferencias de sensibilidad notables (Soares et al., 2007).

Tanto Squires y colaboradores (Squires et al., 2004) como Kumari (Kumari et al., 2004) observaron que p53 previene la acumulación de roturas de doble cadena en las horquillas de replicación producidas por tratamientos con luz UV o hidroxurea. Squires y colaboradores (Squires et al., 2004) demostraron que la proporción de recuperación de las horquillas de replicación dependía de la funcionalidad de p53 ya que en células A2780 con p53 funcional es mucho más rápido la recuperación de las horquillas de replicación que en células EJ-30 (deficientes en p53). El mecanismo por el que p53 estabiliza las horquillas de replicación no está claro. Cuando se bloquea la replicación del ADN p53 es fosforilado en la serina 15 y se asocia con enzimas de recombinación homóloga como el complejo MRN, así como a Rad51, y Rad54 (Linke et al., 2003; Restle et al., 2005; Sengupta et al., 2003; Zink et al., 2002). p53 funcional podría prevenir la acumulación de roturas de la doble cadena reduciendo la respuesta apoptótica al tratamiento de Yondelis®. Sin embargo, en células con p53 mutado que no serían capaces de estabilizar las horquillas de replicación dañadas, conducirían por mecanismos apoptóticos independientes de p53 a la muerte celular.

En concordancia con resultados previamente publicados, nuestros experimentos en células HCT-116 con p53 funcional confirmaron que Yondelis® induce la acumulación de p53 como respuesta al daño del ADN (Erba et al., 2001; Martinez et al., 2005). Sin embargo, la acumulación de p53 no conduce en nuestros sistemas a la inducción de Bax o p21^{CIP1}, observando incluso que los niveles de p21^{CIP1} disminuyen ligeramente. Esto podría deberse a que la actividad transcripcional de p53 se ve afectada en su capacidad

para activar varios genes diana como describe Gottifredi y colaboradores (Gottifredi et al., 2001) en respuesta al bloqueo de la replicación del ADN inducida por hidrox urea. Esta alteración no se debe a un efecto global en la transcripción o traducción después del tratamiento sino más bien a mecanismos de transcripción selectiva. Nosotros también observamos que Yondelis® dispara la activación de la ruta de MEK por incremento de la fosforilación de MAPK y esta activación es dependiente de p53, ya que no se produce en células HCT-116 deficientes para p53. Estos resultados están relacionados con los de Lee y colaboradores (Lee et al., 2000) que observaron que la exposición de células normales a agentes que dañan el ADN induce activación de MAPK de manera dependiente de p53. En este sentido, la fosforilación de p53 por ERK ha sido observada en varios sistemas experimentales (Sablina et al., 2001; She et al., 2001; Singh et al., 2007). La activación de la vía de MEK-MAPK en células con p53 tras el tratamiento con Yondelis®, podría estar suministrando una señal antiapoptótica a través de la regulación de proteínas de la familia BCL2 (Balmanno and Cook, 2009; Sablina et al., 2001; She et al., 2001; Singh et al., 2007).

5.4 APLIDINA®

Aplidina®, es un depsipéptido cíclico aislado originalmente del tunicado marino *Aplidium albicans*, que actualmente se produce de forma sintética. Aplidina®, es un nuevo compuesto antitumoral que está en fase II de ensayos clínicos, y ha mostrado actividad antitumoral en ensayos *in vitro* e *in vivo* contra células tumorales humanas. Aplidina® inhibe la viabilidad celular porque activa el programa apoptótico celular, resultando en alteraciones morfológicas, activación de caspasas, y fragmentación de la cromatina. Concentraciones proapoptóticas de Aplidina® inducen rápidamente un estrés oxidativo que resulta en una activación rápida y persistente de las proteínas quinasas de estrés JNK y p38. La inhibición JNK y en menor medida de p38, bloquea el programa apoptótico inducido por Aplidina®, mostrando que tienen un papel central en la integración del estrés celular inducido por el compuesto. La activación JNK y de p38, resulta finalmente en la activación de la ruta apoptótica mitocondrial (intrínseca), con despolarización de membrana mitocondrial, salida de citocromo c y la activación de caspasas 9 y 3, y la inactivación de PARP. Aplidina® actúa tanto a nivel de membrana celular como en el interior de la célula. En la membrana se produce la activación de Rac-1. En el interior de la célula, Aplidina® reduce los niveles de glutatión reduciendo incrementando el estrés oxidativo. La adición de antioxidantes implicados en la recuperación del poder reductor de glutatión atenúan la acción citotóxica de Aplidina® (Cuadrado et al., 2003; Cuadrado et al., 2004; Garcia-Fernandez et al., 2002; Losada et al., 2004). Se observó que Aplidina® tiene efecto citostático a concentraciones nanomolares induciendo parada en G1 y bloqueo de G2. El compuesto induce perturbaciones en el ciclo celular y muerte celular

que no está asociada con la síntesis de macromoléculas (proteínas, ARN, y ADN) porque los efectos ocurren a concentraciones (por ejemplo a 10 nmol/l) en que la síntesis de macromoléculas no está afectada (Erba et al., 2002).

Nosotros hemos encontrado que los niveles de p27^{KIP1} determinan la sensibilidad a Aplidina® en líneas celulares tumorales humanas y que la eliminación de p27^{KIP1} en estas líneas (por shARN) o en MEFs incrementa la sensibilidad a Aplidina®. Asimismo, encontramos que Aplidina® induce un incremento de los niveles de proteína p27^{KIP1}, pero no su ARNm, y por lo tanto, es un componente de la respuesta al fármaco. p27^{KIP1} podría actuar como un marcador de respuesta a Aplidina®.

La progresión del ciclo celular depende de la expresión de reguladores como las ciclinas que afectan a la activación de CDKs. Miembros de los inhibidores de CDKs son la familia CIP/KIP (que incluye a p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP1}) que promueven la parada de ciclo por la unión e inhibición de los complejos de proteínas ciclina-CDK en respuesta a la ausencia de mitógenos o estrés oxidativo (Malumbres and Carnero, 2003). Estas proteínas se asocian preferentemente con los complejos ciclina-CDK que a la subunidad individual CDK. La sobreexpresión de estas proteínas produce parada del ciclo celular en diferentes fases de acuerdo a su función bioquímica. Concretamente P27^{KIP1} puede unirse e inactivar a CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6, parando el ciclo en G1 o G2-M.

Aplidina® induce un rápido y pronunciado incremento de especies reactivas de oxígeno. En este contexto es bien conocido que la función mitocondrial, bajo condiciones de estrés oxidativo, contribuye en la respuesta apoptótica (Freytag, 1988; Kannan and Jain, 2000; Zamzami et al., 1995). El bloqueo de la producción de especies reactivas de oxígeno por radicales libres inhibe el daño mitocondrial y la apoptosis (Cuadrado et al., 2003; Garcia-Fernandez et al., 2002). Por otra parte, las especies reactivas de oxígeno pueden disparar la acumulación de la proteína p27^{KIP1} a través de la activación de la proteína quinasa p38 (Faust et al., 2005) o JNK, dos quinasas que previamente se ha descrito que están involucradas en la sensibilidad a Aplidina®. La fosforilación de p27^{KIP1} dispara la inhibición de su ubiquitinización y degradación a través de Skp2 (Koff, 2006).

5.5 RESUMEN FINAL

En los últimos años, un gran número de ensayos clínicos con resultados negativos en oncología, ha renovado el interés en el perfeccionamiento de los mismos. Uno de los mayores cambios en el desarrollo de un compuesto es el tener diseños eficientes en fase II para identificar compuestos activos para fase III. La imposibilidad de predecir los pacientes en los que se va a producir resultados eficaces hace que haya un alto número de ensayos fallidos. Por ello, son necesarios los estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que puedan aportar criterios de selección, ya sea del tipo de tumor en el que se puede aplicar

una determinada terapia, o de una alteración molecular particular que permita hacer una selección de los pacientes que pueden responder.

Por todo ello para este trabajo hemos desarrollado un panel de líneas celulares a bajo pase en las que presumiblemente sus características moleculares van a estar más cerca del tumor original. En estas líneas celulares se estudiaron varias características moleculares como expresión de quinasas, genes asociados con el control del ciclo celular, apoptosis, reparación de ADN y transducción de señales. Con cada compuesto se generó un perfil característico de respuesta celular que se asoció con sus características moleculares de manera que nos indicó si la respuesta de las células a un compuesto está relacionada con determinadas alteraciones moleculares.

En base a estos estudios hemos podido identificar marcadores que predicen la sensibilidad y resistencia a diversos compuestos antitumorales de origen marino. Utilizando este sistema hemos sido capaces de identificar la relación funcional de Yondelis® con p53, Zalypsis® con PDGFR α y Aplidina® con p27^{KIP1}. Aunque en todos los casos hemos sido capaces de mostrar cierta causalidad en la respuesta, es posible que un panel mayor de líneas celulares así como un mayor número de marcadores moleculares permita identificar relaciones funcionales aún más significativas desde el punto de vista estadístico, lo que podría repercutir en una más segura identificación de los pacientes susceptibles de responder a los diversos tratamientos.

6 CONCLUSIONES

1. Hemos generado un panel de líneas celulares con bajo número de pases. Este panel incluye líneas de carcinoma, sarcoma, melanoma y tumores del SNC. También se generaron líneas procedentes de biopsias profilácticas en pacientes portadores de mutaciones BRCA.
2. El conjunto de líneas poco pasadas procedentes de sarcomas fueron caracterizadas para expresión de distintos marcadores moleculares (expresión de ARNm y proteína), citogenéticamente y farmacológicamente.
3. Se generó una herramienta analítica para correlacionar los datos farmacológicos con los marcadores moleculares.
4. Existe correlación entre respuesta a Yondelis® y falta de función de p53. El tratamiento con Yondelis® induce un aumento en la cantidad de proteína de p53 sin que se produzca simultáneamente un aumento de la transcripción de sus genes dianas Bax y p21. El tratamiento con Yondelis® indujo la fosforilación de ERK de forma dependiente a p53.
5. Existe correlación entre bajos niveles de la proteína p27^{KIP1} y sensibilidad a Aplidina®. El tratamiento con Aplidina® induce un aumento de los niveles de proteína p27^{KIP1}, por un mecanismo dependiente de oxidación.
6. Existe correlación entre bajos niveles del receptor de PDGF y sensibilidad a Zalypsis®. Esta correlación se extiende a modelos en xenotransplante *in vivo*.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, S.C., Wu, T.T., Klimstra, D.S., Finn, L.S., Lee, J.H., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Hruban, R.H., 2001. Distinctive molecular genetic alterations in sporadic and familial adenomatous polyposis-associated pancreatoblastomas : frequent alterations in the APC/beta-catenin pathway and chromosome 11p. *Am J Pathol* 159, 1619-1627.
- Abramson, D.H., Ellsworth, R.M., Kitchin, F.D., Tung, G., 1984. Second nonocular tumors in retinoblastoma survivors. Are they radiation-induced? *Ophthalmology* 91, 1351-1355.
- Alessi, D.R., Downes, C.P., 1998. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta* 1436, 151-164.
- Awada, A., Mano, M., Hendlisch, A., Piccart, M., 2004. New anticancer agents and therapeutic strategies in development for solid cancers: a clinical perspective. *Expert Rev Anticancer Ther* 4, 53-60.
- Balko, J.M., Potti, A., Saunders, C., Stromberg, A., Haura, E.B., Black, E.P., 2006. Gene expression patterns that predict sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer cell lines and human lung tumors. *BMC Genomics* 7, 289.
- Balmano, K., Cook, S.J., 2009. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 16, 368-377.
- Baynes, R.D., Gansert, J., 2009. KRAS Mutational Status as a Predictor of Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor Efficacy in Colorectal Cancer. *Am J Ther*.
- Berman, J., O'Leary, T.J., 2001. Gastrointestinal stromal tumor workshop. *Hum Pathol* 32, 578-582.
- Bild, A.H., Potti, A., Nevins, J.R., 2006. Linking oncogenic pathways with therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 6, 735-741.
- Blomquist, E., Westermarck, B., Ponten, J., 1980. Ageing of human glial cells in culture: increase in the fraction of non-dividers as demonstrated by a miniclone technique. *Mech Ageing Dev* 12, 173-182.
- Bond, J.A., Haughton, M.F., Rowson, J.M., Smith, P.J., Gire, V., Wynford-Thomas, D., Wyllie, F.S., 1999. Control of replicative life span in human cells: barriers to clonal expansion intermediate between M1 senescence and M2 crisis. *Mol Cell Biol* 19, 3103-3114.
- Brazil, D.P., Hemmings, B.A., 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26, 657-664.
- Campisi, J., 1997. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 33, 703-709.
- Cantley, L.C., 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Cantley, L.C., Neel, B.G., 1999. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4240-4245.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J.C., 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.

Cohen, J.A., Geradts, J., 1997. Loss of RB and MTS1/CDKN2 (p16) expression in human sarcomas. *Hum Pathol* 28, 893-898.

Collado, M., Blasco, M.A., Serrano, M., 2007. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223-233.

Comella, P., Filippelli, G., De Cataldis, G., Massidda, B., Frasci, G., Maiorino, L., Putzu, C., Mancarella, S., Palmeri, S., Cioffi, R., Roselli, M., Buzzi, F., Milia, V., Gambardella, A., Natale, D., Bianco, M., Ghiani, M., Masullo, P., 2007. Efficacy of the combination of cisplatin with either gemcitabine and vinorelbine or gemcitabine and paclitaxel in the treatment of locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: a phase III randomised trial of the Southern Italy Cooperative Oncology Group (SICOG 0101). *Ann Oncol* 18, 324-330.

Cordon-Cardo, C., 1995. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *Am J Pathol* 147, 545-560.

Cordon-Cardo, C., Latres, E., Drobnjak, M., Oliva, M.R., Pollack, D., Woodruff, J.M., Marechal, V., Chen, J., Brennan, M.F., Levine, A.J., 1994. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 54, 794-799.

Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., Bacchetti, S., 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11, 1921-1929.

Creager, A.J., Cohen, J.A., Geradts, J., 2001. Aberrant expression of cell-cycle regulatory proteins in human mesenchymal neoplasia. *Cancer Detect Prev* 25, 123-131.

Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.

Cuadrado, A., Garcia-Fernandez, L.F., Gonzalez, L., Suarez, Y., Losada, A., Alcaide, V., Martinez, T., Fernandez-Sousa, J.M., Sanchez-Puelles, J.M., Munoz, A., 2003. Aplidin induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK. *J Biol Chem* 278, 241-250.

Cuadrado, A., Gonzalez, L., Suarez, Y., Martinez, T., Munoz, A., 2004. JNK activation is critical for Aplidin-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 4673-4680.

Chen, G., Sircar, K., Aprikian, A., Potti, A., Goltzman, D., Rabbani, S.A., 2006. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* 107, 289-298.

Chen, M., Hough, A.M., Lawrence, T.S., 2000. The role of p53 in gemcitabine-mediated cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Chemother Pharmacol* 45, 369-374.

Chkhotua, A.B., Gabusi, E., Altimari, A., D'Errico, A., Yakubovich, M., Vienken, J., Stefoni, S., Chieco, P., Yussim, A., Grigioni, W.F., 2003. Increased expression of p16(INK4a) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes in aging human kidney and chronic allograft nephropathy. *Am J Kidney Dis* 41, 1303-1313.

da Rocha, A.B., Lopes, R.M., Schwartzmann, G., 2001. Natural products in anticancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 1, 364-369.

- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E., 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- de Lange, T., 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19, 2100-2110.
- de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., te Riele, H., 1995. Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell* 82, 321-330.
- Deitel, K., Dantzer, D., Ferguson, P., Pollak, M., Beamer, W., Andrulis, I., Bell, R., 2002. Reduced growth of human sarcoma xenografts in hosts homozygous for the lit mutation. *J Surg Oncol* 81, 75-79.
- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89, 271-277.
- Di Paolo, A., Danesi, R., Del Tacca, M., 2004. Pharmacogenetics of neoplastic diseases: new trends. *Pharmacol Res* 49, 331-342.
- Downward, J., 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10, 262-267.
- Dressman, H.K., Bild, A., Garst, J., Harpole, D., Jr., Potti, A., 2006a. Genomic signatures in non-small-cell lung cancer: targeting the targeted therapies. *Curr Oncol Rep* 8, 252-257.
- Dressman, H.K., Hans, C., Bild, A., Olson, J.A., Rosen, E., Marcom, P.K., Liotcheva, V.B., Jones, E.L., Vujaskovic, Z., Marks, J., Dewhirst, M.W., West, M., Nevins, J.R., Blackwell, K., 2006b. Gene expression profiles of multiple breast cancer phenotypes and response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 12, 819-826.
- Drobnjak, M., Latres, E., Pollack, D., Karpeh, M., Dudas, M., Woodruff, J.M., Brennan, M.F., Cordon-Cardo, C., 1994. Prognostic implications of p53 nuclear overexpression and high proliferation index of Ki-67 in adult soft-tissue sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 86, 549-554.
- Erba, E., Bassano, L., Di Liberti, G., Muradore, I., Chiorino, G., Ubezio, P., Vignati, S., Codegani, A., Desiderio, M.A., Faircloth, G., Jimeno, J., D'Incalci, M., 2002. Cell cycle phase perturbations and apoptosis in tumour cells induced by aplidine. *Br J Cancer* 86, 1510-1517.
- Erba, E., Bergamaschi, D., Bassano, L., Damia, G., Ronzoni, S., Faircloth, G.T., D'Incalci, M., 2001. Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. *Eur J Cancer* 37, 97-105.
- Evan, G.I., Vousden, K.H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- Faivre, S., Kalla, S., Cvitkovic, E., Bourdon, O., Hauteville, D., Dourte, L.M., Bensmaine, M.A., Itzhaki, M., Marty, M., Extra, J.M., 1999a. Oxaliplatin and paclitaxel combination in patients with platinum-pretreated ovarian carcinoma: an investigator-originated compassionate-use experience. *Ann Oncol* 10, 1125-1128.

Faivre, S., Raymond, E., Woynarowski, J.M., Cvitkovic, E., 1999b. Supraadditive effect of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in combination with oxaliplatin in human cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 44, 117-123.

Faragher, R.G., Jones, C.J., Kipling, D., 1998. Telomerase and cellular lifespan: ending the debate? *Nat Biotechnol* 16, 701-702.

Faust, D., Dolado, I., Cuadrado, A., Oesch, F., Weiss, C., Nebreda, A.R., Dietrich, C., 2005. p38alpha MAPK is required for contact inhibition. *Oncogene* 24, 7941-7945.

Fayette, J., Blay, J.Y., 2005. Genetic predictors for drug resistance in soft tissue sarcoma: a review of publications in 2004. *Curr Opin Oncol* 17, 370-375.

Fayette, J., Blay, J.Y., 2006. [Chemotherapy of sarcomas: optimization of existing drugs and new molecules]. *Cancer Radiother* 10, 72-77.

Ferracini, R., Olivero, M., Di Renzo, M.F., Martano, M., De Giovanni, C., Nanni, P., Basso, G., Scotlandi, K., Lollini, P.L., Comoglio, P.M., 1996. Retrogenic expression of the MET proto-oncogene correlates with the invasive phenotype of human rhabdomyosarcomas. *Oncogene* 12, 1697-1705.

Fidler, I.J., 2002. The organ microenvironment and cancer metastasis. *Differentiation* 70, 498-505.

Finkel, T., Serrano, M., Blasco, M.A., 2007. The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767-774.

Freytag, S.O., 1988. Enforced expression of the c-myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into a distinct predifferentiation state in G0/G1. *Mol Cell Biol* 8, 1614-1624.

Galmarini, C.M., Clarke, M.L., Falette, N., Puisieux, A., Mackey, J.R., Dumontet, C., 2002. Expression of a non-functional p53 affects the sensitivity of cancer cells to gemcitabine. *Int J Cancer* 97, 439-445.

Garcia-Fernandez, L.F., Losada, A., Alcaide, V., Alvarez, A.M., Cuadrado, A., Gonzalez, L., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Fernandez-Sousa, J.M., Munoz, A., Sanchez-Puelles, J.M., 2002. Aplidin induces the mitochondrial apoptotic pathway via oxidative stress-mediated JNK and p38 activation and protein kinase C delta. *Oncogene* 21, 7533-7544.

Garcia, J.J., Kramer, M.J., O'Donnell, R.J., Horvai, A.E., 2006. Mismatch repair protein expression and microsatellite instability: a comparison of clear cell sarcoma of soft parts and metastatic melanoma. *Mod Pathol* 19, 950-957.

Gottifredi, V., Shieh, S., Taya, Y., Prives, C., 2001. p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1036-1041.

Graham, F.L., van der Eb, A.J., 1973a. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.

Graham, F.L., van der Eb, A.J., 1973b. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54, 536-539.

Green, H., Kehinde, O., Thomas, J., 1979. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 5665-5668.

- Griffiths, G.J., Koh, M.Y., Brunton, V.G., Cawthorne, C., Reeves, N.A., Greaves, M., Tilby, M.J., Pearson, D.G., Ottley, C.J., Workman, P., Frame, M.C., Dive, C., 2004. Expression of kinase-defective mutants of c-Src in human metastatic colon cancer cells decreases Bcl-xL and increases oxaliplatin- and Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279, 46113-46121.
- Gu, J., Tamura, M., Yamada, K.M., 1998. Tumor suppressor PTEN inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol* 143, 1375-1383.
- Hanahan, D., Bergers, G., Bergsland, E., 2000. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest* 105, 1045-1047.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W., 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harris, K.F., Christensen, J.B., Imperiale, M.J., 1996. BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol* 70, 2378-2386.
- Hay, R.J., Paul, J., 1967. Factors influencing glucose flux and the effect of insulin in cultured human cells. *J Gen Physiol* 50, 1663-1680.
- Haydon, R.C., Deyrup, A., Ishikawa, A., Heck, R., Jiang, W., Zhou, L., Feng, T., King, D., Cheng, H., Breyer, B., Peabody, T., Simon, M.A., Montag, A.G., He, T.C., 2002. Cytoplasmic and/or nuclear accumulation of the beta-catenin protein is a frequent event in human osteosarcoma. *Int J Cancer* 102, 338-342.
- Hayflick, L., 1976. The cell biology of human aging. *N Engl J Med* 295, 1302-1308.
- Hayflick, L., 1997. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62, 1180-1190.
- Hayflick, L., Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Helman, L.J., Meltzer, P., 2003. Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* 3, 685-694.
- Hemmings, B.A., 1997. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* 275, 628-630.
- Hengartner, M.O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Herrero, A.B., Martin-Castellanos, C., Marco, E., Gago, F., Moreno, S., 2006. Cross-talk between nucleotide excision and homologous recombination DNA repair pathways in the mechanism of action of antitumor trabectedin. *Cancer Res* 66, 8155-8162.
- Hinds, P., Finlay, C., Levine, A.J., 1989. Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 63, 739-746.
- Hinds, P.W., Finlay, C.A., Quartin, R.S., Baker, S.J., Fearon, E.R., Vogelstein, B., Levine, A.J., 1990. Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ* 1, 571-580.

- Hoeijmakers, J.H., 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hoeijmakers, J.H., 2007. Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases. *Mech Ageing Dev* 128, 460-462.
- Hornick, J.L., Fletcher, C.D., 2002. Immunohistochemical staining for KIT (CD117) in soft tissue sarcomas is very limited in distribution. *Am J Clin Pathol* 117, 188-193.
- Hynes, R.O., George, E.L., Georges, E.N., Guan, J.L., Rayburn, H., Yang, J.T., 1992. Toward a genetic analysis of cell-matrix adhesion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57, 249-258.
- Iau, P.T., Macmillan, R.D., Blamey, R.W., 2001. Germ line mutations associated with breast cancer susceptibility. *Eur J Cancer* 37, 300-321.
- Ishizawar, R., Parsons, S.J., 2004. c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell* 6, 209-214.
- Isonishi, S., Saitou, M., Yasuda, M., Tanaka, T., 2007. Differential regulation of the cytotoxicity activity of paclitaxel by orobol and platelet derived growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Oncol Rep* 18, 195-201.
- Izbicka, E., Lawrence, R., Raymond, E., Eckhardt, G., Faircloth, G., Jimeno, J., Clark, G., Von Hoff, D.D., 1998. In vitro antitumor activity of the novel marine agent, ecteinascidin-743 (ET-743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. *Ann Oncol* 9, 981-987.
- Johnson, M.D., Okedli, E., Woodard, A., Toms, S.A., Allen, G.S., 2002. Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-p7S6K pathway activation and transduction of mitogenic signals by platelet-derived growth factor in meningioma cells. *J Neurosurg* 97, 668-675.
- Jordan, M.A., Wilson, L., 1998. Use of drugs to study role of microtubule assembly dynamics in living cells. *Methods Enzymol* 298, 252-276.
- Kang, D.E., Yoon, I.S., Repetto, E., Busse, T., Yermian, N., Ie, L., Koo, E.H., 2005. Presenilins mediate phosphatidylinositol 3-kinase/AKT and ERK activation via select signaling receptors. Selectivity of PS2 in platelet-derived growth factor signaling. *J Biol Chem* 280, 31537-31547.
- Kannan, K., Jain, S.K., 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 153-163.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez-Viciano, P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J., Evan, G., 1997. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* 385, 544-548.
- Kawaguchi, K., Oda, Y., Takahira, T., Saito, T., Yamamoto, H., Kobayashi, C., Tamiya, S., Oda, S., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M., 2005. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in soft tissue sarcomas. *Oncol Rep* 13, 241-246.
- Kielb, S.J., Shah, N.L., Rubin, M.A., Sanda, M.G., 2001. Functional p53 mutation as a molecular determinant of paclitaxel and gemcitabine susceptibility in human bladder cancer. *J Urol* 166, 482-487.

- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W., 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.
- Kim, S.J., Uehara, H., Yazici, S., Langle, R.R., He, J., Tsan, R., Fan, D., Killion, J.J., Fidler, I.J., 2004. Simultaneous blockade of platelet-derived growth factor-receptor and epidermal growth factor-receptor signaling and systemic administration of paclitaxel as therapy for human prostate cancer metastasis in bone of nude mice. *Cancer Res* 64, 4201-4208.
- King, A.A., Debaun, M.R., Riccardi, V.M., Gutmann, D.H., 2000. Malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *Am J Med Genet* 93, 388-392.
- Koff, A., 2006. How to decrease p27Kip1 levels during tumor development. *Cancer Cell* 9, 75-76.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., Sharpless, N.E., 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 114, 1299-1307.
- Krystal, G.W., Sulanke, G., Litz, J., 2002. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling blocks growth, promotes apoptosis, and enhances sensitivity of small cell lung cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 1, 913-922.
- Kuhnen, C., Herter, P., Muller, O., Muehlberger, T., Krause, L., Homann, H., Steinau, H.U., Muller, K.M., 2000a. Beta-catenin in soft tissue sarcomas: expression is related to proliferative activity in high-grade sarcomas. *Mod Pathol* 13, 1005-1013.
- Kuhnen, C., Lehnhardt, M., Tolnay, E., Muehlberger, T., Vogt, P.M., Muller, K.M., 2000b. Patterns of expression and secretion of vascular endothelial growth factor in malignant soft-tissue tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 219-225.
- Kumari, A., Schultz, N., Helleday, T., 2004. p53 protects from replication-associated DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Oncogene* 23, 2324-2329.
- Kuroda, M., Ishida, T., Takanashi, M., Satoh, M., Machinami, R., Watanabe, T., 1997. Oncogenic transformation and inhibition of adipocytic conversion of preadipocytes by TLS/FUS-CHOP type II chimeric protein. *Am J Pathol* 151, 735-744.
- Kurschat, P., Mauch, C., 2000. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol* 25, 482-489.
- Latres, E., Drobnjak, M., Pollack, D., Oliva, M.R., Ramos, M., Karpeh, M., Woodruff, J.M., Cordon-Cardo, C., 1994. Chromosome 17 abnormalities and TP53 mutations in adult soft tissue sarcomas. *Am J Pathol* 145, 345-355.
- Lazar, A., Abruzzo, L.V., Pollock, R.E., Lee, S., Czerniak, B., 2006. Molecular diagnosis of sarcomas: chromosomal translocations in sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 130, 1199-1207.
- Le Cesne, A., Blay, J.Y., Judson, I., Van Oosterom, A., Verweij, J., Radford, J., Lorigan, P., Rodenhuis, S., Ray-Coquard, I., Bonvalot, S., Collin, F., Jimeno, J., Di Paola, E., Van Glabbeke, M., Nielsen, O.S., 2005. Phase II study of ET-743 in advanced soft tissue sarcomas: a European Organisation for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) soft tissue and bone sarcoma group trial. *J Clin Oncol* 23, 576-584.
- Leach, F.S., Tokino, T., Meltzer, P., Burrell, M., Oliner, J.D., Smith, S., Hill, D.E., Sidransky, D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1993. p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 53, 2231-2234.

- Lee, S.W., Fang, L., Igarashi, M., Ouchi, T., Lu, K.P., Aaronson, S.A., 2000. Sustained activation of Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase cascade by the tumor suppressor p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8302-8305.
- Leonce, S., Kraus-Berthier, L., Golsteyn, R.M., David-Cordonnier, M.H., Tardy, C., Lansiaux, A., Poindessous, V., Larsen, A.K., Pierre, A., 2006. Generation of replication-dependent double-strand breaks by the novel N2-G-alkylator S23906-1. *Cancer Res* 66, 7203-7210.
- Levine, A.J., 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Li, F.P., Fraumeni, J.F., Jr., 1969. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71, 747-752.
- Li, G., Bush, J.A., Ho, V.C., 2000. p53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin. *J Invest Dermatol* 114, 514-519.
- Li, G., Tang, L., Zhou, X., Tron, V., Ho, V., 1998. Chemotherapy-induced apoptosis in melanoma cells is p53 dependent. *Melanoma Res* 8, 17-23.
- Li, L., Ernstring, B.R., Wishart, M.J., Lohse, D.L., Dixon, J.E., 1997. A family of putative tumor suppressors is structurally and functionally conserved in humans and yeast. *J Biol Chem* 272, 29403-29406.
- Li, W.W., Takahashi, N., Jhanwar, S., Cordon-Cardo, C., Elisseyeff, Y., Jimeno, J., Faircloth, G., Bertino, J.R., 2001. Sensitivity of soft tissue sarcoma cell lines to chemotherapeutic agents: identification of ecteinascidin-743 as a potent cytotoxic agent. *Clin Cancer Res* 7, 2908-2911.
- Link, W., Rosado, A., Fominaya, J., Thomas, J.E., Carnero, A., 2005. Membrane localization of all class I PI 3-kinase isoforms suppresses c-Myc-induced apoptosis in Rat1 fibroblasts via Akt. *J Cell Biochem* 95, 979-989.
- Linke, S.P., Sengupta, S., Khabie, N., Jeffries, B.A., Buchhop, S., Miska, S., Henning, W., Pedoux, R., Wang, X.W., Hofseth, L.J., Yang, Q., Garfield, S.H., Sturzbecher, H.W., Harris, C.C., 2003. p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res* 63, 2596-2605.
- Longley, D.B., Johnston, P.G., 2005. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 205, 275-292.
- Losada, A., Lopez-Oliva, J.M., Sanchez-Puelles, J.M., Garcia-Fernandez, L.F., 2004. Establishment and characterisation of a human carcinoma cell line with acquired resistance to Aplidin. *Br J Cancer* 91, 1405-1413.
- Lu, K., Shih, C., Teicher, B.A., 2000. Expression of pRB, cyclin/cyclin-dependent kinases and E2F1/DP-1 in human tumor lines in cell culture and in xenograft tissues and response to cell cycle agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 46, 293-304.
- Mackall, C.L., Meltzer, P.S., Helman, L.J., 2002. Focus on sarcomas. *Cancer Cell* 2, 175-178.
- Macleod, K., 2000. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 10, 81-93.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Jr., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A., et al., 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233-1238.

- Malumbres, M., Carnero, A., 2003. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 5, 5-18.
- Mann, J., 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nat Rev Cancer* 2, 143-148.
- Martinez, N., Sanchez-Beato, M., Carnero, A., Moneo, V., Tercero, J.C., Fernandez, I., Navarrete, M., Jimeno, J., Piris, M.A., 2005. Transcriptional signature of Ecteinascidin 743 (Yondelis, Trabectedin) in human sarcoma cells explanted from chemo-naïve patients. *Mol Cancer Ther* 4, 814-823.
- Maru, Y., 2001. Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol* 73, 308-322.
- May, W.A., Lessnick, S.L., Braun, B.S., Klemsz, M., Lewis, B.C., Lunsford, L.B., Hromas, R., Denny, C.T., 1993. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 13, 7393-7398.
- McGary, E.C., Weber, K., Mills, L., Doucet, M., Lewis, V., Lev, D.C., Fidler, I.J., Bar-Eli, M., 2002. Inhibition of platelet-derived growth factor-mediated proliferation of osteosarcoma cells by the novel tyrosine kinase inhibitor STI571. *Clin Cancer Res* 8, 3584-3591.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L., Burgering, B.M., 2000. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.
- Merchant, M.S., Woo, C.W., Mackall, C.L., Thiele, C.J., 2002. Potential use of imatinib in Ewing's Sarcoma: evidence for in vitro and in vivo activity. *J Natl Cancer Inst* 94, 1673-1679.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., Peeper, D.S., 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720-724.
- Michalopoulos, G., Pitot, H.C., 1975. Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Morphological and biochemical observations. *Exp Cell Res* 94, 70-78.
- Michalopoulos, G., Sattler, G.L., Pitot, H.C., 1978. Hormonal regulation and the effects of glucose on tyrosine aminotransferase activity in adult rat hepatocytes cultured on floating collagen membranes. *Cancer Res* 38, 1550-1555.
- Morales, C.P., Gandia, K.G., Ramirez, R.D., Wright, W.E., Shay, J.W., Spechler, S.J., 2003. Characterisation of telomerase immortalised normal human oesophageal squamous cells. *Gut* 52, 327-333.
- Morin, G.B., 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521-529.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66, 1022-1037.

Ng, T.L., Gown, A.M., Barry, T.S., Cheang, M.C., Chan, A.K., Turbin, D.A., Hsu, F.D., West, R.B., Nielsen, T.O., 2005. Nuclear beta-catenin in mesenchymal tumors. *Mod Pathol* 18, 68-74.

Nicholson, K.M., Anderson, N.G., 2002. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 14, 381-395.

Niedernhofer, L.J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A.F., de Wit, J., Jaspers, N.G., Beverloo, H.B., Hoeijmakers, J.H., Kanaar, R., 2004. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 24, 5776-5787.

Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., et al., 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342, 705-708.

Nishida, T., Hirota, S., Taniguchi, M., Hashimoto, K., Isozaki, K., Nakamura, H., Kanakura, Y., Tanaka, T., Takabayashi, A., Matsuda, H., Kitamura, Y., 1998. Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet* 19, 323-324.

Nozell, S., Wu, Y., McNaughton, K., Liu, G., Willis, A., Paik, J.C., Chen, X., 2003. Characterization of p73 functional domains necessary for transactivation and growth suppression. *Oncogene* 22, 4333-4347.

Osuna, D., de Alava, E., 2009. Molecular pathology of sarcomas. *Rev Recent Clin Trials* 4, 12-26.

Page, M.J., Field, J.K., Green, C.D., 1978. The response to hormones and anti-hormones of human breast tumour cells grown in continuous culture [proceedings]. *Biochem Soc Trans* 6, 1318-1319.

Palmeri, S., Lorusso, V., Palmeri, L., Vaglica, M., Porta, C., Nortilli, R., Ferrau, F., Comella, G., Massidda, B., Danova, M., 2006. Cisplatin and gemcitabine with either vinorelbine or paclitaxel in the treatment of carcinomas of unknown primary site : results of an Italian multicenter, randomized, phase II study. *Cancer* 107, 2898-2905.

Park, J.G., Park, Y.J., Wijnen, J.T., Vasen, H.F., 1999. Gene-environment interaction in hereditary nonpolyposis colorectal cancer with implications for diagnosis and genetic testing. *Int J Cancer* 82, 516-519.

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., Campisi, J., 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5, 741-747.

Pommier, Y., Kohlhagen, G., Bailly, C., Waring, M., Mazumder, A., Kohn, K.W., 1996. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry* 35, 13303-13309.

Popat, S., Matakidou, A., Houlston, R.S., 2004. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 22, 529-536.

Potti, A., Dressman, H.K., Bild, A., Riedel, R.F., Chan, G., Sayer, R., Cragun, J., Cottrill, H., Kelley, M.J., Petersen, R., Harpole, D., Marks, J., Berchuck, A., Ginsburg, G.S., Febbo, P.,

- Lancaster, J., Nevins, J.R., 2006. Genomic signatures to guide the use of chemotherapeutics. *Nat Med* 12, 1294-1300.
- Pratsinis, H., Kletsas, D., 2007. PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways. *Eur Spine J* 16, 1858-1866.
- Ramirez, R.D., Herbert, B.S., Vaughan, M.B., Zou, Y., Gandia, K., Morales, C.P., Wright, W.E., Shay, J.W., 2003. Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon overexpression of Cdk4 in normal human epithelial cells. *Oncogene* 22, 433-444.
- Ramirez, R.D., Sheridan, S., Girard, L., Sato, M., Kim, Y., Pollack, J., Peyton, M., Zou, Y., Kurie, J.M., Dimaio, J.M., Milchgrub, S., Smith, A.L., Souza, R.F., Gilbey, L., Zhang, X., Gandia, K., Vaughan, M.B., Wright, W.E., Gazdar, A.F., Shay, J.W., Minna, J.D., 2004. Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res* 64, 9027-9034.
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Durr, P., Wlaschek, M., 2006. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 5, 379-389.
- Restle, A., Janz, C., Wiesmuller, L., 2005. Differences in the association of p53 phosphorylated on serine 15 and key enzymes of homologous recombination. *Oncogene* 24, 4380-4387.
- Robertson, D.M., Li, L., Fisher, S., Pearce, V.P., Shay, J.W., Wright, W.E., Cavanagh, H.D., Jester, J.V., 2005. Characterization of growth and differentiation in a telomerase-immortalized human corneal epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 470-478.
- Rubin, B.P., Singer, S., Tsao, C., Duensing, A., Lux, M.L., Ruiz, R., Hibbard, M.K., Chen, C.J., Xiao, S., Tuveson, D.A., Demetri, G.D., Fletcher, C.D., Fletcher, J.A., 2001. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 61, 8118-8121.
- Rubin, H., 1998. Telomerase and cellular lifespan: ending the debate? *Nat Biotechnol* 16, 396-397.
- Ruiz, L., Traskine, M., Ferrer, I., Castro, E., Leal, J.F., Kaufman, M., Carnero, A., 2008. Characterization of the p53 response to oncogene-induced senescence. *PLoS ONE* 3, e3230.
- Ryan, D.P., Appleman, L.J., Lynch, T., Supko, J.G., Fidas, P., Clark, J.W., Fishman, M., Zhu, A.X., Enzinger, P.C., Kashala, O., Cusack, J., Jr., Eder, J.P., 2006. Phase I clinical trial of bortezomib in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 107, 2482-2489.
- Sabah, M., Cummins, R., Leader, M., Kay, E., 2006. Aberrant expression of the Rb pathway proteins in soft tissue sarcomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 14, 397-403.
- Sablina, A.A., Chumakov, P.M., Levine, A.J., Kopnin, B.P., 2001. p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling. *Oncogene* 20, 899-909.
- Saito, T., Oda, Y., Sakamoto, A., Kawaguchi, K., Tanaka, K., Matsuda, S., Tamiya, S., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M., 2002. APC mutations in synovial sarcoma. *J Pathol* 196, 445-449.

- Saito, T., Oda, Y., Yamamoto, H., Kawaguchi, K., Tanaka, K., Matsuda, S., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M., 2006. Nuclear beta-catenin correlates with cyclin D1 expression in spindle and pleomorphic sarcomas but not in synovial sarcoma. *Hum Pathol* 37, 689-697.
- Sakamoto, A., Oda, Y., Adachi, T., Saito, T., Tamiya, S., Iwamoto, Y., Tsuneyoshi, M., 2002. Beta-catenin accumulation and gene mutation in exon 3 in dedifferentiated liposarcoma and malignant fibrous histiocytoma. *Arch Pathol Lab Med* 126, 1071-1078.
- Scotlandi, K., Perdichizzi, S., Manara, M.C., Serra, M., Benini, S., Cerisano, V., Strammiello, R., Mercuri, M., Reverter-Branchat, G., Faircloth, G., D'Incalci, M., Picci, P., 2002. Effectiveness of Ecteinascidin-743 against drug-sensitive and -resistant bone tumor cells. *Clin Cancer Res* 8, 3893-3903.
- Scheid, M.P., Woodgett, J.R., 2001. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 760-768.
- Schlessinger, J., 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Sengupta, S., Linke, S.P., Pedoux, R., Yang, Q., Farnsworth, J., Garfield, S.H., Valerie, K., Shay, J.W., Ellis, N.A., Wasylyk, B., Harris, C.C., 2003. BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. *EMBO J* 22, 1210-1222.
- Seve, P., Mackey, J., Isaac, S., Tredan, O., Souquet, P.J., Perol, M., Lai, R., Voloch, A., Dumontet, C., 2005. Class III beta-tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. *Mol Cancer Ther* 4, 2001-2007.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M., Wright, W.E., 1991. A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 196, 33-39.
- She, Q.B., Bode, A.M., Ma, W.Y., Chen, N.Y., Dong, Z., 2001. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res* 61, 1604-1610.
- Shoemaker, R.H., 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Rev Cancer* 6, 813-823.
- Siddik, Z.H., 2002. Biochemical and molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Cancer Treat Res* 112, 263-284.
- Singh, S., Upadhyay, A.K., Ajay, A.K., Bhat, M.K., 2007. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: a novel target of p53 in apoptosis. *FEBS Lett* 581, 289-295.
- Soares, D.G., Escargueil, A.E., Poindessous, V., Sarasin, A., de Gramont, A., Bonatto, D., Henriques, J.A., Larsen, A.K., 2007. Replication and homologous recombination repair regulate DNA double-strand break formation by the antitumor alkylator ecteinascidin 743. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13062-13067.
- Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Gomez-Roman, J.J., Li, Y., Sausville, E.A., Sawai, E.T., Gutkind, J.S., 2004. Akt plays a central role in sarcomagenesis induced by Kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4821-4826.

- Squires, S., Coates, J.A., Goldberg, M., Toji, L.H., Jackson, S.P., Clarke, D.J., Johnson, R.T., 2004. p53 prevents the accumulation of double-strand DNA breaks at stalled-replication forks induced by UV in human cells. *Cell Cycle* 3, 1543-1557.
- Stadler, W.M., Halabi, S., Rini, B., Ernstoff, M.S., Davila, E., Picus, J., Barrier, R., Small, E.J., 2006. A phase II study of gemcitabine and capecitabine in metastatic renal cancer: a report of Cancer and Leukemia Group B protocol 90008. *Cancer* 107, 1273-1279.
- Steck, P.A., Pershouse, M.A., Jasser, S.A., Yung, W.K., Lin, H., Ligon, A.H., Langford, L.A., Baumgard, M.L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D.H., Tavtigian, S.V., 1997. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15, 356-362.
- Stormorken, A.T., Bowitz-Lothe, I.M., Noren, T., Kure, E., Aase, S., Wijnen, J., Apold, J., Heimdal, K., Moller, P., 2005. Immunohistochemistry identifies carriers of mismatch repair gene defects causing hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23, 4705-4712.
- Suggitt, M., Bibby, M.C., 2005. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. *Clin Cancer Res* 11, 971-981.
- Takahashi, N., Li, W.W., Banerjee, D., Scotto, K.W., Bertino, J.R., 2001. Sequence-dependent enhancement of cytotoxicity produced by ecteinascidin 743 (ET-743) with doxorubicin or paclitaxel in soft tissue sarcoma cells. *Clin Cancer Res* 7, 3251-3257.
- Takebayashi, Y., Pourquier, P., Zimonjic, D.B., Nakayama, K., Emmert, S., Ueda, T., Urasaki, Y., Kanzaki, A., Akiyama, S.I., Popescu, N., Kraemer, K.H., Pommier, Y., 2001. Antiproliferative activity of ecteinascidin 743 is dependent upon transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nat Med* 7, 961-966.
- Tamborini, E., Papini, D., Mezzelani, A., Riva, C., Azzarelli, A., Sozzi, G., Pierotti, M.A., Pilotti, S., 2001. c-KIT and c-KIT ligand (SCF) in synovial sarcoma (SS): an mRNA expression analysis in 23 cases. *Br J Cancer* 85, 405-411.
- Taubert, H.W., Bartel, F., Kappler, M., Schuster, K., Meye, A., Lautenschlager, C., Thamm-Mucke, B., Bache, M., Schmidt, H., Holzhausen, H.J., Wurl, P., 2003. Reduced expression of hMSH2 protein is correlated to poor survival for soft tissue sarcoma patients. *Cancer* 97, 2273-2278.
- Taylor, C.C., 2000. Platelet-derived growth factor activates porcine thecal cell phosphatidylinositol-3-kinase-Akt/PKB and ras-extracellular signal-regulated kinase-1/2 kinase signaling pathways via the platelet-derived growth factor-beta receptor. *Endocrinology* 141, 1545-1553.
- te Poele, R.H., Joel, S.P., 1999. Schedule-dependent cytotoxicity of SN-38 in p53 wild-type and mutant colon adenocarcinoma cell lines. *Br J Cancer* 81, 1285-1293.
- te Poele, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., Joel, S.P., 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 62, 1876-1883.
- Toguchida, J., Yamaguchi, T., Ritchie, B., Beauchamp, R.L., Dayton, S.H., Herrera, G.E., Yamamuro, T., Kotoura, Y., Sasaki, M.S., Little, J.B., et al., 1992. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 52, 6194-6199.

Tomescu, O., Barr, F.G., 2001. Chromosomal translocations in sarcomas: prospects for therapy. *Trends Mol Med* 7, 554-559.

Tomicic, M.T., Christmann, M., Kaina, B., 2005. Topotecan-triggered degradation of topoisomerase I is p53-dependent and impacts cell survival. *Cancer Res* 65, 8920-8926.

Topley, P., Jenkins, D.C., Jessup, E.A., Stables, J.N., 1993. Effect of reconstituted basement membrane components on the growth of a panel of human tumour cell lines in nude mice. *Br J Cancer* 67, 953-958.

Tsuchiya, R., Yamamoto, G., Nagoshi, Y., Aida, T., Irie, T., Tachikawa, T., 2004. Expression of adenomatous polyposis coli (APC) in tumorigenesis of human oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 40, 932-940.

Ueno, Y., Enomoto, T., Otsuki, Y., Sugita, N., Nakashima, R., Yoshino, K., Kuragaki, C., Ueda, Y., Aki, T., Ikegami, H., Yamazaki, M., Ito, K., Nagamatsu, M., Nishizaki, T., Asada, M., Kameda, T., Wakimoto, A., Mizutani, T., Yamada, T., Murata, Y., 2006. Prognostic significance of p53 mutation in suboptimally resected advanced ovarian carcinoma treated with the combination chemotherapy of paclitaxel and carboplatin. *Cancer Lett* 241, 289-300.

Vaziri, H., Benchimol, S., 1999. Alternative pathways for the extension of cellular life span: inactivation of p53/pRb and expression of telomerase. *Oncogene* 18, 7676-7680.

Vaziri, H., Squire, J.A., Pandita, T.K., Bradley, G., Kuba, R.M., Zhang, H., Gulyas, S., Hill, R.P., Nolan, G.P., Benchimol, S., 1999. Analysis of genomic integrity and p53-dependent G1 checkpoint in telomerase-induced extended-life-span human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19, 2373-2379.

Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.

Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.

Vojta, P.J., Barrett, J.C., 1995. Genetic analysis of cellular senescence. *Biochim Biophys Acta* 1242, 29-41.

Wallenius, V., Hisaoka, M., Helou, K., Levan, G., Mandahl, N., Meis-Kindblom, J.M., Kindblom, L.G., Jansson, J.O., 2000. Overexpression of the hepatocyte growth factor (HGF) receptor (Met) and presence of a truncated and activated intracellular HGF receptor fragment in locally aggressive/malignant human musculoskeletal tumors. *Am J Pathol* 156, 821-829.

Wan, X., Helman, L.J., 2003. Levels of PTEN protein modulate Akt phosphorylation on serine 473, but not on threonine 308, in IGF-II-overexpressing rhabdomyosarcomas cells. *Oncogene* 22, 8205-8211.

Wang, Y., Zhu, S., Cloughesy, T.F., Liao, L.M., Mischel, P.S., 2004. p53 disruption profoundly alters the response of human glioblastoma cells to DNA topoisomerase I inhibition. *Oncogene* 23, 1283-1290.

Weinberg, R.A., 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.

West, K.A., Castillo, S.S., Dennis, P.A., 2002. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* 5, 234-248.

- Willis, A.C., Pipes, T., Zhu, J., Chen, X., 2003. p73 can suppress the proliferation of cells that express mutant p53. *Oncogene* 22, 5481-5495.
- Wright, W.E., Shay, J.W., 1992. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 27, 383-389.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445, 656-660.
- Yamada, K.M., Geiger, B., 1997. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 9, 76-85.
- Yang, G., Rosen, D.G., Mercado-Urbe, I., Colacino, J.A., Mills, G.B., Bast, R.C., Jr., Zhou, C., Liu, J., 2007. Knockdown of p53 combined with expression of the catalytic subunit of telomerase is sufficient to immortalize primary human ovarian surface epithelial cells. *Carcinogenesis* 28, 174-182.
- Yi, H., Fujimura, Y., Ouchida, M., Prasad, D.D., Rao, V.N., Reddy, E.S., 1997. Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. *Oncogene* 14, 1259-1268.
- Yoo, J., Park, S., Kang, C.S., Kang, S.J., Kim, B.K., 2002. Expression of E-cadherin and p53 proteins in human soft tissue sarcomas. *Arch Pathol Lab Med* 126, 33-38.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G., 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med* 182, 367-377.
- Zewail-Foote, M., Hurley, L.H., 1999. Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. *J Med Chem* 42, 2493-2497.
- Zheng, M., Wang, H., Zhang, H., Ou, Q., Shen, B., Li, N., Yu, B., 1999. The influence of the p53 gene on the in vitro chemosensitivity of colorectal cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 125, 357-360.
- Zink, D., Mayr, C., Janz, C., Wiesmuller, L., 2002. Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase. *Oncogene* 21, 4788-4800.

8 ANEXO
